Pr 3966

HALIOTIS

VOL. 30
2000 (2001)

issn 0397.765 x

SOCIETE FRANÇAISE DE MALACOLOGIE

Haliotis, revue de la Société Française de Malacologie, est ouverte à des articles originaux couvrant tous les aspects de l'étude des Mollusques. Son rythme de parution est en principe annuel, avec un ou plusieurs fascicules.

La soumission d'un manuscrit à *Haliotis* sous-entend qu'il n'est pas publié ou sous presse ailleurs. Les auteurs qui désireront utiliser ultérieurement des matériaux publiés dans *Haliotis* devront préalablement obtenir la permission de la S.F.M.

Soumission des manuscrits

Les textes doivent être saisis sous un traitement de texte d'usage courant. Il sera soumis dans un premier temps deux exemplaires tirés sur format A4 avec double interligne, ainsi que deux copies des illustrations. Les manuscrits sont à adresser au secrétariat général de la S.F.M., 55 rue Buffon, 75005 Paris, ou à un des membres du comité de rédaction.

Le manuscrit sera lu par un ou plusieurs spécialistes choisi(s) par le comité de rédaction, dont les commentaires seront adressés à l'auteur (sous forme anonyme ou non au choix du rapporteur). L'auteur a l'obligation de prendre en considération les commentaires du rapporteur et adressera s'il y a lieu une version révisée. Le comité de rédaction prendra alors, au vu des commentaires du rapporteur, une décision d'acceptation ou de refus du manuscrit.

Organisation du texte

- titre concis et informatif: pensez qu'il doit servir à l'indexation. Si le titre contient un nom de genre ou d'espèce peu connu, ce nom sera accompagné du nom d'un taxon supraspécifique
- prénoms (en entier) et noms des auteurs
- adresses des auteurs.
- "abstract" en Anglais, précédé du titre en Anglais.
- résumé français (dans la langue du texte de l'article) exposant les principaux résultats, mais pas de descriptions de taxa nouveaux éventuellement introduits dans l'article.; éventuellement, résumé dans une autre langue si approprié.
- texte proprement dit comprenant, dans cet ordre, Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusions, Remerciements, Bibliographie.

Les niveaux hiérarchiques de sous-titres seront limités le plus possible. Les sous-titres ne seront en aucun cas numérotés.

Illustrations

Seules les illustrations en noir et blanc seront prises en charge par la revue. Le surcoût des illustrations en couleur sera à la charge des auteurs. Les illustrations, à leur taille définitive, mesurent au maximum 16,5 x 23 cm.

Les illustrations soumises après acceptation des manuscrits doivent être de bonne qualité, prêtes à clicher, ou des fichers électroniques au format TIFF, 600 ppp (noir et blanc) ou 300 ppp (demi-teintes). Pour les graphiques, des tirages d'imprimante laser ou à jet d'encre sur papier sont acceptables comme originaux, mais il est préférable d'adresser une copie électronique, au format TIFF ou dans le format natif du logiciel qui a produit le graphique si celui-ci est d'usage courant (Excel, Corel Draw...) *En aucun cas, les illustrations préalablement insérées dans un traitement de texte (Word ou autre) ne pourront être reproduites par l'imprimeur (ces logiciels altèrent les fichiers d'images insérées).*

Toutes les figures doivent être numérotées en une série unique, qu'il s'agisse de dessins, de photographies montées en planche, de cartes ou de graphiques. Les cartes devront faire figurer des coordonnées géographiques et avoir un cadre. Les tableaux (comportant exclusivement du texte ou des chiffres, à l'exclusion de graphiques) seront numérotés en une autre série. Les légendes des figures et des tableaux seront regroupées sur une feuille à part, et copiées également dans la disquette. Les auteurs pourront indiquer dans le texte la position souhaitée des figures et tableaux.

(suite sur la 3e page de couverture)

5 NUX

Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction

Jorge CHAVEZ-VILLALBA[1], *Christian MINGANT*[2], *Jean Claude COCHARD*[2] *et Marcel LE PENNEC*[1]

ABSTRACT

Gametogenesis in the oyster *Crassostrea gigas* from Aber Benoît (Brittany, France), at the northern limit of its area of reproduction.

A study of gametogenesis and larval yield ("D" larvae) was carried out from December 1998 to January 2000 on a reared population of *Crassostrea gigas* from the Aber Benoît (Brittany, France). This site is considered as the North limit reproduction area of this species. The gonadal analysis of oysters was performed using semi-quantitative histology. Three oyster lots (n=150) were conditioned using standard procedures for oocyte production and larval yield estimations during December 1998, February and April 1999 respectively. Afterwards, the oyster's lots were collected each month until January (except August), but these animals were not conditioned. The results from the semi-quantitative analysis show that primary oocyte proliferation begins in December and follows until February. Oocyte growth continues until June when the mature stage is reached by the oysters. There is a partial emission of gametes between June and July, and the development of a new oocyte generation that reaches its maturity en September is observed at the same time. These oocytes are not released and their reabsorption within the gonad occurs from September until January. At the end of conditionings carried out in February, April and June 1999 the oysters produced 4.8 ± 1.5, 7.1 ± 2.3 and 46.4 ± 8.4 millions of oocytes respectively. The number of oocytes recovered by scarification in the oysters not conditioned oscillated between 59.7 ± 2.2 (n = 5) and 4.9 ± 3.3 (n = 3) millions in July and December respectively. Larval yield estimated between February and September is in concordance with results reported in the literature for *C. gigas* in France. The oysters were capable of producing viable oocytes and larvae even within the period

[1] U.M.R. C.N.R.S. 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France
[2] IFREMER Centre de Brest, Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, BP 70, 29280 Plouzané, France

BIBL. DU MUSEUM PARIS

Bibliothèque Centrale Muséum
3 3001 00176785 3

October-December, the sexual resting period reported for this species. The gamete development in males is also reported in this study. The implication of the results obtained in this study on the larval production in hatcheries is discussed.

RÉSUMÉ

Une étude de la gamétogenèse et du taux d'éclosion de larves "D" en laboratoire a été réalisée de décembre 1998 à janvier 2000 sur une population de *Crassostrea gigas* élevée dans l'Aber Benoît (Bretagne, France). Ce site est considéré comme étant à la limite nord de la reproduction de cette espèce en Atlantique. L'analyse de la gonade des animaux a été faite par histologie semi-quantitative. Pour l'obtention d'ovocytes et l'estimation du taux d'éclosion larvaire des lots d'huîtres (n=150) ont été mis en conditionnement à 19°C pendant six semaines, en décembre 1998, février et avril 1999. Par la suite des échantillons ont été prélevés chaque mois jusqu'à janvier 2000 (sauf août), mais les huîtres n'ont pas été conditionnées. Les résultats de l'analyse semi-quantitative montrent que la prolifération des ovocytes primaires commence en décembre et continue jusqu'en février. La croissance ovocytaire se déroule jusqu'à juin où les huîtres arrivent à l'état de maturité. Entre juin et juillet existe une émission partielle de gamètes et en même temps se développe une nouvelle génération d'ovocytes dont la maturité surviendra en septembre. Cependant, ces ovocytes ne sont pas émis et leur résorption dans la gonade se produit de septembre à janvier. Au cours des expériences de conditionnement en février, avril et juin 1999, les huîtres ont émis 4.8 ± 1.5, 7.1 ± 2.3 et 46.4 ± 8.4 millions d'ovocytes respectivement. Le nombre d'ovocytes obtenus par scarification chez les huîtres non conditionnées a oscillé entre 59.7 ± 2.2 (n = 5) et 4.9 ± 3.3 (n = 3) millions en juillet et décembre 1999 respectivement. Le taux d'éclosion larvaire, calculé entre février et septembre, est en concordance avec les résultats rapportés dans la littérature pour *C. gigas* en France. Les huîtres ont été capables de produire des ovocytes et des larves viables jusqu'en octobre- décembre, période considérée comme de repos sexuel pour l'espèce. Les stades du développement gamétique chez les huîtres mâles sont également rapportés. L'ensemble des résultats et leurs implications sur la production de larves en écloserie sont discutés.

INTRODUCTION

L'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a été réintroduite en France en 1966 pour remplacer les populations anciennement établies, connues sous le nom d'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, victime d'une épizootie (Chevalier *et al.*, 1975). Depuis 1994 la production annuelle d'huître creuse sur les côtes françaises est estimée à 150000 t/an, plaçant la France au quatrième rang mondial et au premier rang européen des pays producteurs de *C. gigas* (Dauvin, 1997).

A titre indicatif, parmi les 135000 t d'huître creuse produites en France en 1997, 25% sont d'origine bretonne dont 1200 t proviennent de la région des Abers (nord Finistère). Cependant, depuis quelques années les ostréiculteurs des Abers constatent un ralentissement de la croissance de leurs huîtres, des anomalies coquillières (chambrage) et une irrégularité du cycle de reproduction. Ainsi, chez ces huîtres, malgré une évidente maturation des gonades, il semble y avoir une absence d'émission des gamètes pendant la période de reproduction. Chez trois populations d'huîtres cultivées en France (deux populations en Bretagne et une autre en Poitou-Charente), la période de ponte se déroule entre juillet et septembre, et la résorption des gamètes non émis dans la gonade a lieu d'août à septembre (Lango-Reynoso, 1999). Néanmoins, la résorption des gamètes des huîtres provenant l'Aber Benoît est très tardive et elle se déroule

progressivement jusqu'à décembre. Ce fait a des répercussions économiques importantes puisque les huîtres présentent un aspect "laiteux" en été et en automne qui les rend difficilement commercialisables.

Il existe peu d'information sur les mollusques de l'Aber Benoît et notamment sur les huîtres. Des études sont cependant réalisées par l'IFREMER depuis 1991 dans le cadre du réseau de suivi de la croissance de l'huître creuse sur les côtes françaises (programme REMORA), et des analyses concernant une éventuelle contamination des eaux par le TBT (tributylétain) ont également été effectuées par l'IFREMER en 1998 (Goyard, 1996; 1997; Michel, 1998). Il n'existe aucune donnee concernant le cycle de reproduction de cette espèce dans cette région et à notre connaissance, aucune étude sur le développement de la gamétogenèse n'a encore été réalisée sur ces huîtres.

Le présent travail a comme objectif de faire connaître la biologie de la reproduction de *C. gigas* dans la région des Abers, et de fournir des données sur le conditionnement et la production de gamètes de cette population en laboratoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour déterminer les dates de prélèvement des échantillons et les périodes de conditionnement des huîtres, nous avons utilisé les résultats des variations saisonnières des diamètres moyens des ovocytes de *C. gigas* de l'anse du Roz (rade de Brest, Bretagne) rapportées par Lango-Reynoso (1999), cette population étant la plus proche géographiquement de celle de l'Aber Benoît (Fig. 1). Nous avons, au cours d'une première période, prélevé des animaux pour l'étude histologique et en même temps conditionné des huîtres en laboratoire car celle-ci correspond *in situ* à une phase de croissance de gamètes de décembre 1998 jusqu'à leur maturité en juin 1999 (Lango-Reynoso, 1999). Puis, dans une deuxième période, de juillet 1999 à janvier 2000, nous avons suivi l'émission des gamètes ou leur résorption dans la gonade. Les huîtres qui ont été utilisées au cours de cette étude ont été collectées dans le bassin d'Arcachon 1996 et prégrossies dans le golfe du Morbihan (Larmor Baden) jusqu'en avril 1998 date à laquelle, elles ont été transférées dans l'Aber Benoît.

Conditionnement et prélèvements d'huîtres

Pour les expériences de conditionnement, réalisées au Centre IFREMER de Brest, nous avons prélevé dans l'Aber Benoît trois lots de 150 huîtres (masse moyenne totale = 57.4 ± 1.1 gr., n = 100). Ceux-ci ont été effectués en décembre 1998, en février et avril 1999. À leur arrivée au laboratoire, les huîtres ont été débarrassées de leurs épibiontes et réparties aléatoirement dans les bacs de conditionnement où elles ont été alimentées en continu par un mélange de microalgues de deux espèces phytoplanctoniques: *Isochrysis* aff. *galbana* Green (Clone T-iso; Tahiti *Isochrysis*) et *Chaetoceros calcitrans* Takano, à raison d'environ 10^9 cellules de chaque espèce/jour/animal (Robert et Trintignac, 1997). La température de l'eau dans les bacs de maturation a été d'abord réglée sur celle rencontrée dans le milieu naturel lors de la récolte et, après deux ou trois jours d'acclimatation, elle a été ensuite augmentée progressivement de 1°C par jour jusqu'à 19°C, puis maintenue constante à plus ou moins 0,5°C pendant 6 semaines

(conditionnement standard). Trois expériences de conditionnement ont été réalisées: de décembre 1998 à février 1999, de février à avril 1999 et d'avril à juin 1999.

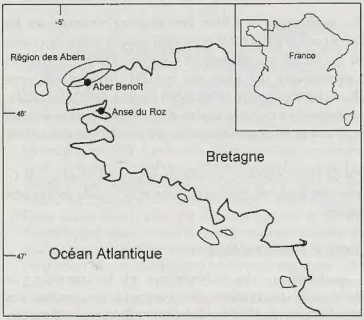

Figure 1. Localisation géographique des populations d'huîtres *Crassostrea gigas*.

Un échantillon de 10 à 15 individus a été prélevé au hasard à l'arrivée des huîtres au laboratoire et à la fin des expériences de conditionnement en vue d'analyses histologiques de la gonade. Les animaux restants après les conditionnements ont subi une scarification de la gonade afin d'obtenir des gamètes (Allen et Bushek, 1992). La totalité des ovocytes a été récupérée dans des béchers de 2 à 5 l, 3 échantillons de 50 µl de chaque bécher ont été prélevés afin de réaliser le comptage au moyen d'un projecteur de profil. Pour la deuxième partie de l'étude, des prélèvements mensuels ont été réalisés de juin 1999 à janvier 2000 (sauf août). À chaque fois 30 huîtres au minimum ont été récoltées pour des analyses histologiques et une scarification de la gonade (10 à 15 animaux ont été utilisés pour l'analyse histologique et de 15 à 20 pour la scarification de la gonade).

Immédiatement après toutes les expériences de scarification les ovocytes ont été fécondés par addition d'un mélange de sperme de plusieurs mâles selon la méthode décrite par Robert *et* Gérard (1999). La fécondation des ovocytes a été vérifiée au microscope. Un nombre équivalent d'embryons de chaque huître a été mis en élevage dans un seul bac cylindro-conique de 150 litres rempli d'eau de mer filtrée à 1 µm. La densité des embryons était de 33/ml et la température de l'eau maintenue à 20°C. Après 48 heures, les bacs ont été vidangés et les larves "D" récupérées sur un tamis de 40 µm. Trois échantillons ont été prélevés afin de réaliser le comptage larvaire et déterminer le taux d'éclosion.

Analyse histologique semi-quantitative

Une pièce standard de masse viscérale a été coupée juste au-dessus de la cavité péricardique chez chaque individu échantillonné pour l'étude histologique (10 à 15 huîtres par échantillon), et

elle a été fixée au liquide de Bouin durant 48 heures. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de degré croissant et deux bains de toluène et, finalement, ont été inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées et montées sur lames porte-objets. Ces coupes ont été ensuite colorées avec une solution d'hematoxiline-éosine Y (Martoja et Martoja-Pearson, 1967). Les préparations ont été observées sous un microscope muni d'une caméra vidéo. Les images ont été enregistrées et traitées par l'analyseur Silicon Graphics Station (Logiciel Visilog 5.1) pour la détermination de la taille des ovocytes et leur fréquence et l'activité gamétogénétique.

La mesure des ovocytes et leur classification ont été réalisées selon la méthode décrite par Lango-Reynoso *et al.* (2000). Cette opération a été faite sur 100 ovocytes sélectionnés aléatoirement par huître et les mesures ont été effectuées selon une procédure standardisée de manière à éviter les biais lors de la sélection des champs d'analyses. Des transects ont été tracés verticalement ou horizontalement sur les préparations histologiques de manière à suivre les aires qui contenaient le plus d'ovocytes et maximiser la couverture des champs. Tous les ovocytes contenus à l'intérieur d'un champ et qui présentaient un noyau bien défini ont été mesurés. Chaque ovocyte ainsi mesuré a été assigné à un stade de maturation gonadique en fonction de son diamètre et des caractéristiques histologiques de la gonade (tab. 1). Nous avons distingué quatre phases de maturation chez les mâles en se basant sur les caractéristiques cytologiques de la gonade (tab. 2).

Analyses statistiques

Les proportions relatives à chaque stade de développement gamétique ont été calculées et transformées en arc-sinus pour chacune des huîtres (Snedecor *et* Cochran, 1972). Les données correspondant à la production d'ovocytes ont subi une transformation logarithmique. Les données transformées des proportions comme des ovocytes produits ont été comparées à l'aide du test de Kruskall-Wallis ($P<0.05$) en utilisant le programme STATGRAPHICS-Plus.

RÉSULTATS

Gamétogenèse

L'observation des ovocytes de *C. gigas* montrent qu'en décembre 1998 leur croissance commence même s'il existe encore dans la gonade une grande proportion d'ovocytes résiduels (45%). En février 1999 les ovocytes résiduels ont disparu et les ovocytes en début de gamétogenèse augmentent significativement ($P<0.05$) dans la gonade. En avril, il y a une multiplication significative d'ovocytes en croissance ($P<0.05$), et les premiers ovocytes de taille mature sont observés. Tous les ovocytes arrivent à maturité en juin. En juillet une prolifération significative ($P<0.05$) d'ovocytes en début de gamétogenèse est constatée, il en est de même pour ceux qui sont en vitellogenèse. Les ovocytes matures occupent à nouveau la totalité de la gonade en septembre et octobre et une augmentation significative d'ovocytes prévitellogéniques ($P<0.05$) se produit à partir de novembre. Des ovocytes résiduels persistent de novembre jusqu'à janvier 2000 (fig. 2).

Tableau 1. Classification des stades de développement gamétique des huîtres femelles de *Crassostrea gigas* proposée par Lango-Reynoso *et al.* (2000). Chaque stade de développement est basé sur un intervalle de taille déterminé par le diamètre des ovocytes (µm). Les caractéristiques cytologiques correspondant à chaque intervalle (taille des ovocytes) ont été également inclus.

Stades	Intervalle des stades (µm)	Description histologique
Début de gamétogenèse	3.0–12.0	Les acini sont peu développés en nombre et en volume dans le tissu conjonctif. Les parois des tubules sont tapissées de cellules primaires qui possèdent un noyau de grand taille et présentent un cytoplasme peu abondant
Croissance	12.1–30.0	Les cellules restent adhérantes à la paroi des acini mais elles entrent en croissance, c'est la phase de vitellogenèse. Du fait de l'augmentation de la taille des acini, le tissu conjonctif a quasiment disparu
Maturité	30.1–41.0	Les acini sont complètement remplis d'ovocytes matures (avec une taille relativement homogène), qui présentent un noyau distinctif et parfois le nucléole est visible
Dégénérescence	41.1–60.0	Les acini contiennent des ovocytes en état de dégénérescence, parfois allongés, parfois déchirés. Le développement de petits ovocytes est évident sur les parois des acini

Tableau 2. Classification des stades de développement gamétique des huîtres mâles de *Crassostrea gigas* proposée dans cette étude.

Stades	Description histologique
Début de gamétogenèse	La lignée germinale est réduite à quelques travées cellulaires comprenant des spermatogonies et quelques spermatocytes, baignant dans un tissu conjonctif vésiculeux particulièrement abondant
Croissance	Les acini gagnent en volume et les séquences normales de la spermatogenèse y sont observées avec des spermatocytes I et II, des spermatides et quelques spermatozoïdes. Ces derniers s'organisent radialement dans la lumière de l'acinus, l'acrosome semblant rattaché aux spermatides et le flagelle étant orienté dans la lumière
Maturité	Le tissu conjonctif vésiculeux est considérablement réduit. Les spermatozoïdes abondent et forment des paquets dans la lumière des follicules
Dégénérescence	Quelques spermatozoïdes sont observés dans la lumière des acini, ainsi que de jeunes cellules le long des parois des acini

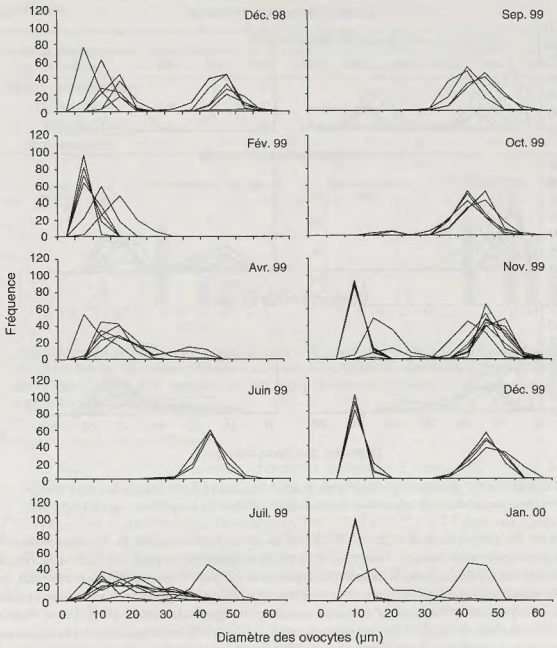

Figure 2. Evolution des diamètres ovocytaires des huîtres *Crassostrea gigas* provenant de l'Aber Benoît. Chaque ligne représente un seul individu.

Les résultats des analyses histologiques réalisées lors des conditionnements (fig. 3) montrent que pour la première expérience (décembre 1998 – février 1999) les ovocytes résiduels ont disparu à la fin du conditionnement. On n'observe pas de différences significatives ($P<0.05$)

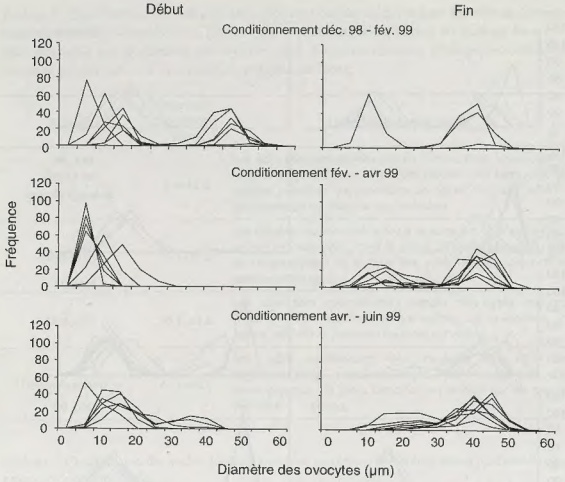

Figure 3. Evolution des diamètres ovocytaires des huîtres *Crassostrea gigas* provenant de l'Aber Benoît après trois expériences de conditionnement en laboratoire. Chaque ligne représente un seul individu.

concernant les proportions d'ovocytes en début de gamétogenèse entre le début et la fin de l'expérience, mais les ovocytes matures ont augmenté significativement ($P<0.05$) à la fin du conditionnement (66%). Pour la deuxième expérience (février – avril 1999), les ovocytes en début de gamétogenèse diminuent significativement ($P<0.05$) à la fin du conditionnement tandis que les ovocytes en croissance et matures augmentent significativement ($P<0.05$) en même temps. Les résultats de la dernière expérience (avril – juin 1999) sont quasiment identiques au conditionnement antérieur, mais la proportion d'ovocytes matures est cette fois plus élevée (61 et 73% respectivement).

Dans le cas des mâles, la présence d'huîtres matures a été constatée tout au long de l'étude, sauf en février. Les animaux en début de gamétogenèse ont été observés en 1999 en février et avril, puis en octobre et finalement en janvier 2000, alors que stades de croissance sont rencontrés de décembre 1998 à avril 1999, en concordance avec la période de développement gonadique. Des gonades en dégénérescence sont remarquées de septembre 1999 à janvier 2000 (tab. 3).

Tableau 3. Nombre d'huîtres mâles de *Crassostrea gigas* observées et leurs stades de développement gamétique.

Stades de développement gamétique	Période d'étude (décembre 1998 – janvier 2000)									
	Déc.	Fév.	Avr.	Juin	Juil.	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.
Début de gamétogenèse		2	1				2			1
Croissance	2	2	1							
Maturité	3		2	1	2	4	3	4	2	4
Dégénérescence						1		4	5	3

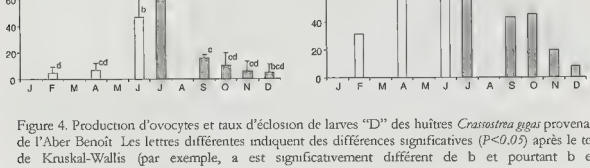

Figure 4. Production d'ovocytes et taux d'éclosion de larves "D" des huîtres *Crassostrea gigas* provenant de l'Aber Benoît. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($P<0.05$) après le test de Kruskal-Wallis (par exemple, a est significativement différent de b et pourtant b est significativement différent de c).

Production d'ovocytes et taux d'éclosion

La figure 4 montre le nombre d'ovocytes (moyenne ± écart-type) obtenus lors des conditionnements (février, avril et juin) et à partir des huîtres provenant directement du milieu naturel. Les analyses statistiques montrent, après la transformation logarithmique, que le nombre d'ovocytes obtenus augmente significativement ($P<0.05$) d'avril (7.1 ± 2.3 millions) à juin (46.4 ± 8.4 millions) et également de juin à juillet (59.7 ± 2.2 millions). Ensuite il diminue significativement ($P<0.05$) en septembre (15.3 ± 1.2 millions) et à partir de cette date il n'y a plus de différences significatives ($P<0.05$). En janvier 2000 il a été impossible d'obtenir des ovocytes viables après scarification. Concernant le taux d'éclosion, la figure 4 montre les valeurs obtenues dans le seul bac utilisé à chaque expérience. Le pourcentage le plus haut (74.6%) correspond aux huîtres conditionnées de février à avril. Les pourcentages de juin et juillet (relatifs à la période de ponte dans la nature) oscillent entre 62 et 56%. Les taux d'éclosion de septembre à décembre diminuent de 43 à 8%.

DISCUSSION

Lango-Reynoso *et al.* (2000) ont réalisé une étude du cycle gamétogénétique chez trois populations de *Crassostrea gigas* en France: l'anse du Roz et la pointe du Château ,dans la rade de Brest et Marennes Oléron (Charente Maritime). Ces auteurs montrent que le cycle est fortement

saisonnier avec de petites variations dépendantes de la zone géographique. En général, la prolifération des ovocytes primaires commence en novembre et se poursuit jusqu'en février et la croissance ovocytaire se déroule jusqu'à juin ou juillet. À cette période, les huîtres arrivent à l'état de maturité, les émissions gamétiques se produisent et la résorption des ovocytes résiduels se déroule d'août à octobre. Les résultats histologiques de cette étude montrent que la gamétogenèse chez les huîtres de l'Aber Benoît est identique à celle des trois populations décrites par Lango-Reynoso *et al.* (2000). Cependant, la présence d'ovocytes résiduels est constatée de septembre 1999 à janvier 2000, en raison de l'absence d'émission de gamètes. Toutefois, les résultats histologiques de juin et juillet 1999, révèlent que les ovocytes matures détectés en juin ne sont plus présents dans la gonade en juillet, ceci pouvant être dû à une émission partielle de gamètes pendant cette période. De plus, au cours de ce mois on observe des ovocytes en début de gamétogenèse et en croissance, ce qui indique l'évolution d'une nouvelle génération de cellules sexuelles dans la gonade. Malgré le manque d'observations en août, on peut penser que la présence de 100% d'ovocytes matures en septembre démontre que la génération de jeunes ovocytes remarquée en juillet est arrivée à maturité près de deux mois plus tard. Ces résultats traduisent l'existence d'une ponte partielle entre juin et juillet. En août – septembre les ovocytes provenant de la nouvelle génération ne sont pas émis, probablement en raison d'une baisse des températures puisque chez les huîtres les émissions gamétiques sont directement corrélées à la température de l'eau (Shumway, 1996). Ce fort contingent d'ovocytes pourrait expliquer pourquoi le processus de résorption des gamètes dans la gonade chez les huîtres de l'Aber Benoît se prolonge jusqu'en janvier.

Les résultats histologiques relatifs aux conditionnements montrent que l'obtention d'ovocytes matures est possible à partir de février et jusqu'en juin lors du dernier conditionnement. Signalons que, pendant l'expérience menée de décembre 1998 à février 1999, il y avait au début du conditionnement des ovocytes résiduels dans la gonade et que les huîtres ont produit 66% d'ovocytes matures. Dupuy *et al.* (1977) ont remarqué chez *Crassostrea virginica*, que pour initier le conditionnement il est important que les huîtres aient totalement pondu parce que la résorption des ovocytes non émis retarde proportionnellement la reprise de la gamétogenèse. Il semble que pour les huîtres de l'Aber Benoît il n'est pas nécessaire d'attendre que la résorption soit entièrement terminée pour redémarrer une gamétogenèse. Néanmoins, il serait opportun de faire des essais de conditionnement pendant la période automnale quand il existe encore des ovocytes résiduels dans la gonade pour confirmer les résultats antérieurs.

Nous avons observé au cours de cette étude, que pour décrire correctement la spermatogenèse il est nécessaire augmenter le nombre d'huîtres par échantillon puisque la proportion de mâles reste toujours faible au cours du temps . De plus, nous avons constaté que la différentiation des stades est difficile à déterminer. Une approche quantitative est donc nécessaire pour mieux comprendre la spermatogenèse chez *C. gigas*.

Concernant les résultats de production d'ovocytes et les taux d'éclosion en laboratoire, ceux ci montrent que les huîtres conditionnées en laboratoire entre décembre-février et février-avril ont la plus basse production d'ovocytes, mais le taux d'éclosion le plus haut est observé en avril. En général, chez les bivalves des régions tempérées le tissu gonadique présente un développement cyclique complémentaire de celui du tissu de réserve. Les nutriments s'accumulent pendant l'hiver et sont utilisés progressivement au cours du cycle sexuel pour

couvrir les dépenses énergétiques et assurer la synthèse de lipides (Le Pennec, 1981). En observant les résultats histologiques obtenus en avril, il est possible de constater que la proportion d'ovocytes matures dans la gonade représente moins de 20% de la population cellulaire. Il semble donc que les ovocytes qui sont arrivés à maturité disposent d'une quantité de réserves suffisante pour assurer la survie larvaire pendant cette période. Le Pennec *et al.* (1998) signalent qu'en dehors de la saison de reproduction le pectinidé *Pecten maximus* émet peu d'ovocytes, mais que ceux ci présentent un fort taux de fécondation et une survie élevée. Enfin, l'ensemble des résultats concernant le taux d'éclosion est en concordance avec les données rapportées par Robert et Gérard (1999) pour *C. gigas*.

Dans le cycle gamétogénétique de *C. gigas*, l'automne est considérée comme une période de repos sexuel durant laquelle il est très difficile d'obtenir une production significative de gamètes en laboratoire (Barret *et al.*, 1999). En fait, pour la plupart des auteurs, la saison de production en écloserie commence en hiver et les géniteurs sont conditionnés à partir de décembre voire plus tard (Dupuy *et al.*, 1977; Wilson, 1981). Pour notre part nous avons constaté, d'après les expériences réalisées entre septembre et décembre, qu'il est possible obtenir des gamètes viables pendant la période de repos sexuel chez les huîtres de l'Aber Benoît. Nos résultats montrent qu'en octobre – novembre, une quantité d'ovocytes est présente, identique à celle existante en février et en avril et le taux d'éclosion est relativement élevé en septembre et octobre. Lango-Reynoso (1999) suggère que, pendant l'hiver, les ovocytes de *C. gigas* en développement vont utiliser l'énergie provenant des ovocytes en atrésie et de ceux qui ne vont jamais arriver à maturité. Par contre, les résultats de notre étude indiquent que des ovocytes viables restent pour une longue période dans la gonade et que leur résorption se déroule très lentement chez les huîtres de l'Aber Benoît. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que la non-résorption des gamètes soit liée à une abondance de ressources trophiques dans cette région. Il serait donc important de comparer les niveaux de disponibilité de phytoplancton dans l'Aber Benoît à l'automne avec ceux des sites où les gamètes sont résorbés. D'un point de vue pratique, la possibilité de produire des ovocytes viables pendant l'époque considérée comme étant celle d'un repos sexuel chez *C. gigas*, pourrait prolonger la période de production de naissains dans les écloseries. Ceci aurait des conséquences économiques importantes car les ostréiculteurs expriment de plus en plus souvent une demande de naissains en dehors de la saison de captage.

Bien que les résultats que nous avons obtenus semblent prometteurs, des recherches prenant en compte l'influence des paramètres environnementaux sur la gamétogenèse des huîtres de l'Aber Benoît, notamment la température et la disponibilité de la nourriture, doivent être entreprises. Il serait également intéressant de poursuivre les expériences au laboratoire sur l'élevage larvaire pendant la période de repos sexuel des adultes de manière à définir de nouvelles dispositions pour l'aquaculture de cette espèce.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le CONACyT (Mexique) qui a octroyé une bourse de doctorat d'université à Jorge Chávez-Villalba et l'IFREMER pour le financement de contrats universitaires (UBO, No. 98/2521 426). Les auteurs remercient aussi Julien Pommier (LEMAR/IUEM) pour son aide en analyses d'images.

RÉFÉRENCES

Allen S.K. & Bushek D , 1992 Large scale production of triploid oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) using "stripped" gametes. *Aquaculture* **103**. 241-251.

Barret J , Chávez-Villalba J , Cochard J C & Mingant C., 1999 Conditionnement automnal de *Crassostrea gigas*. Journées Conchylicoles IFREMER 1999, Nantes, France 61: 26 p

Chevallier H , Grainer J & Lucas A. 1975. Mollusques marins des côtes de France commercialisés pour la consommation. *Haliotis* **5**: 107-118

Dauvin J C , 1997 Les biocénoses marines et littorales françaises des côtes Atlantiques, Manche et Mer du Nord. Synthèse, Menaces et Perspectives. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 199-206.

Dupuy J L., Windsor N T. & Sutton C.E 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery Special Report Applied Sciences on Ocean Engineering, Va Inst. Mar Sci., VIMS, Gloucester Point, VA (USA), 120 pp.

Goyard E , 1996 Bilan national de la croissance de l'huître creuse de 1993 à 1995. Rapport IFREMER, 34 p.

Goyard E., 1997. Réseau de suivi de la croissance de l'huître creuse sur les côtes françaises Résultats nationaux, année 96. Rapport IFREMER, 28 p.

Lango Reynoso F., 1999. Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France, 170 p

Lango-Reynoso F., Chávez-Villalba J , Cochard J.C & Le Pennec M , 2000 Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190: 183-199.

Le Pennec M., 1981 Les méthodes expérimentales induisant la ponte chez les mollusques marins. *Haliotis* **11**: 139-155

Le Pennec M., Robert R. & Avendaño M., 1998 The importance of gonadal development on larval production in pectinids. *Journal of Shellfish Research* **17**(1): 97-101

Martoja R & Martoja-Pierson M , 1967 Initiation aux techniques de l'histologie animale Masson et Cie, Paris, 1232 p.

Michel J P , 1998. Rapport d'étude sur la contamination des eaux de l'Aber Benoît et de l'Aber Wrac'h par les composés organostanniques. Rapport IFREMER, 7 p.

Robert R. & Trintignac P , 1997. Microalgues et nutrition larvaire en écloserie de mollusques *Haliotis* **26**: 1-13.

Robert R & Gérard A., 1999. Bivalve hatchery technology. The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* **12**(2). 121-130

Shumway S E., 1996. Natural Environmental Factors. In. The Eastern oyster *Crassostrea virginica* (V Kennedy, R. Newell & A. Eble, eds.): 467-513. Maryland Sea Grant Books, Maryland.

Snedecor G.W. & Cochran W.S , 1972 Statistical methods. Iowa State College Press, Ames, 593 p

Wilson J., 1981. Hatchery rearing of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Aquaculture technical bulletin. National Board for Science and Technology Report, Ireland, 32 pp.

Variabilite génétique de la palourde *Ruditapes decussatus* de la côte nord-est tunisienne

Najoua TRIGUI EL MENIF [1], *Marcel LE PENNEC* [2] *et Amor EL ABED* [3]

ABSTRACT

Genetic variability of the European clam *Ruditapes decussatus* from the northwestern Tunisian coast.

A biogeographic analysis of the genetic structure of the European clam *Ruditapes decussatus*, collected in three localities of the North Tunisia (lagoons of Bizerte, Tunis and the channel of the Goulette) was conducted using enzyme electrophoresis on starch gel on the adductor muscle and the digestive gland. Nine enzyme systems were analyzed. Lap, Pgm, Pgi, Mdh, 6 Pgd, Idh, Aat, α-Pgd and Hk. Six loci are polymorphic and are used in order to compare the three populations The rates of average heterozygosity and of registered polymorphism are respectively 0.317 (67%), 0.321 (56%) and 0 337 (78%) at Menzel-Jemil, in Goulette channel and in the lake of Tunis The very low values of Nei's distance show that the three populations are genetically close to each other We report the presence of some characteristic alleles notably the Lap 1 ^{96}, the Mdh-2 ^{90} and the Pgi ^{90} (in the lake of Tunis) and the 6-Pgd ^{95} (in Goulette channel).

RÉSUMÉ

Une analyse biogéographique de la structure génétique de populations de palourdes européennes *Ruditapes decussatus* prélevées dans trois stations nord de la Tunisie. Menzel-Jemil (lac de Bizerte), le lac de Tunis et le canal de la Goulette, est réalisée par électrophorèse enzymatique sur gel d'amidon sur le muscle adducteur et la glande digestive. Neuf systèmes enzymatiques sont analysés: Lap, Pgm, Pgi, Mdh,

1 Laboratoire de Biologie Animale, Département de Biologie, Faculté des Sciences de Sfax, Université du Sud, Route de la Soukra, km 3.5, Sfax, Tunisie.
2 Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Site Technopole Brest Iroise, F-29280 Plouzané.
3 Institut National des Sciences et Techniques de la Mer, Salammbo, Tunisie.

6-Pgd, Idh, Aat, α-Pgd et Hk. Six loci se montrent polymorphes et sont utilisés pour comparer les trois populations. Les taux d'hétérozygotie moyen et de polymorphisme enregistrés sont de 0.317 (67° o), de 0.321 (56%) et de 0.337 (78%) respectivement à Menzel-Jemil, dans le canal de la Goulette et dans le lac de Tunis. Les valeurs très faibles de la distance de Nei montrent que les trois populations sont proches génétiquement. Nous signalons la présence de quelques allèles caractéristiques, notamment le Lap-1 ^{96}, Mdh-2 ^{90}, Pgi ^{80} (lac de Tunis) et le 6-Pgd ^{95} (canal de la Goulette).

INTRODUCTION

La palourde européenne *Ruditapes decussatus* (L., 1758) compte parmi les espèces de bivalves retenues pour un développement de l'aquaculture en Tunisie. Depuis 1950, la palourde tunisienne est intensivement exploitée par la pêche artisanale et cet effort de pêche, en réponse à des demandes qui ne cessent d'augmenter sur le marché européen, a entraîné un épuisement de certains sites. Le recours à la production artificielle devient par conséquent de plus en plus indispensable. Pour cela, une étude approfondie de la biologie de cette espèce autochtone a été entreprise concernant notamment les croissances relative et absolue (El Menif, 1993, 1994; El Menif *et al.*, 1996), le cycle reproducteur (El Menif *et al.*, 1995) et les modalités de la maturation des gonades ainsi que la qualité des ovocytes émis par ponte provoquée de géniteurs (El Menif *et al.*, 1996). Toutes ces études montrent que la palourde se comporte différemment d'un site à l'autre en fonction des conditions du milieu.

Depuis les années 1990, des essais d'élevage sont effectués dans des écloseries privées et étatiques à partir de géniteurs issus de populations sauvages. Les résultats auxquels les professionnels aboutissent ne sont pas encore totalement reproductibles et nécessitent la mise en place de recherches supplémentaires d'ordre pathologique, physiologique, nutritionnel et génétique. Ce dernier point a retenu notre attention et c'est pourquoi nous proposons l'étude de la variabilité génétique d'individus de trois populations de *Ruditapes decussatus* prélevées dans trois stations du littoral nord tunisien. Le choix des systèmes enzymatiques étudiés est basé sur le fait que plusieurs parmi eux sont déjà connus pour être polymorphes chez les bivalves.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites d'étude

Les analyses sont effectuées sur trois populations de palourdes récoltées au hasard à raison de 100 individus dans chacune des stations de Menzel-Jemil (lac de Bizerte, fig. 1a), du lac nord de Tunis (fig. 1b) et du canal de la Goulette (fig. 1b). La taille des individus varie de 21.94 à 42.12 mm pour la population de Bizerte, de 23.38 à 61.84 mm pour celle du lac de Tunis et de 19 à 47.68 mm pour celle du canal de la Goulette, les moyennes étant respectivement de 33.49 mm, 33.38 mm et 31.45 mm.

La lagune de Bizerte, d'une superficie de 15000 ha, présente une profondeur moyenne ne dépassant pas les 7-8 m sauf au niveau du canal de communication où elle peut atteindre 12 m (Soussi, 1981). La température moyenne estivale varie de 27 à 28.6°C contre 10-10.5°C en hiver (Zaouali, 1977; 1984; Aissa, 1991). La salinité oscille entre 28-29 g/l durant la période de fortes précipitations et entre 38-39 g/l pendant la saison estivale (Azouz, 1966; Zaouali, 1984). Le sédiment vaseux est riche en matière organique dans les zones littorales (Zaouali, 1977).

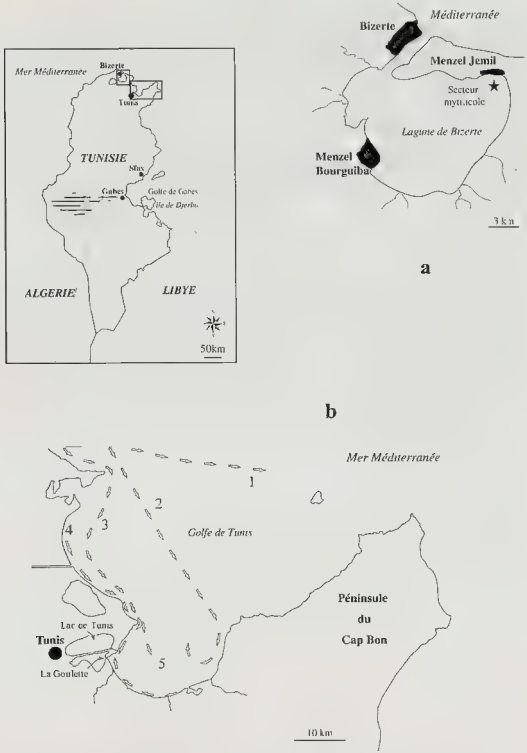

Figure 1 Lieux de prélèvements de palourdes. (a) Menzel Jemil (Lac de Bizerte), (b) Lac nord de Tunis et canal de La Goulette 1, 2, 3 courantologie principale du golfe de Tunis et dérive littorale (4,5) (d'après El Arrim, 1996).

La lagune nord de Tunis couvre environ 2600 ha (Vanberk et Oostinga, 1992), la profondeur moyenne étant de 4.5 m. Le sédiment est constitué par de la vase grise riche en matière organique (Carbonel et *al.*, 1985). La température de l'eau varie de 10.5°C en hiver à 29.4°C en été avec une moyenne de 19.7°C (Zaouali, 1977) et la salinité oscille entre 35 g/l à 40 g/l (Zaouali, 1977).

Le canal de navigation de la Goulette a une profondeur moyenne de 8 m, une longueur de l'ordre de 12 km pour 0.6 km de large. Il présente un sédiment vaseux très riche en matière organique. Sur ce canal sont construits trois des plus grands ports de Tunisie (Tunis, Goulette et Radès) induisant une pollution dans le golfe de Tunis La température de l'eau est comprise entre 32°C en été et 14-15°C en hiver (Chouba et *al.*, 1998). La salinité varie de 25 g/l à 42 g/l (Khedir et *al.*, 1998).

Traitement des échantillons:

Sur chaque palourde, les muscles adducteurs et la glande digestive sont prélevés et mis séparément dans des tubes eppendorf contenant 0.4 ml de tampon d'extraction (Tris 0.01 M, pH 8, EDTA 10^{-3} M, NADP 4°/oo) broyés puis centrifugés à 10000 g pendant 10 minutes avant d'être conservés à –80°C jusqu'au moment de l'électrophorèse. L'analyse porte sur neuf systèmes enzymatiques: Lap (EC 3-4-11 1), Pgm (EC 5-1-2-2), Pgi (EC 5 3 1 9), Mdh (EC 1 1 1 37), 6Pgd (EC 1-1-1-44), Idh (EC 1 1-1-42), Aat (EC 2-6 1 1), α Pgd (EC 1-1-1-8) et Hk (EC 2-7-1-1). Les extraits de la glande digestive sont utilisés pour étudier les systèmes enzymatiques suivants: Lap, Idh , α-Pgd, Aat et Hk, alors que les extraits du muscle adducteur sont utilisés pour les autres systèmes. Les protéines des extraits sont séparées par électrophorèse horizontale sur gel d'amidon à 11% en système continu (tampon tris citrate: Tris 0 62 M, acide citrique 0.14 M, pH 8) ou bien en système discontinu (tampon Poulik gel: Tris 0.07 M, acide citrique 0.005 M, pH 8.7; Tampon Poulik électrodes: acide borique 0.3 M, NaOH 0.006 M, pH 8.2). La nature du tampon utilisé est fonction du système enzymatique analysé. Les allèles de chaque locus sont désignés en fonction de leur mobilité électrophorétique relative par rapport à une allozyme de référence nommé «100» qui est l'allozyme la plus fréquente dans la population étudiée pour le locus considéré.

L'ensemble des données électrophorétiques est traité par les logiciels GENETIX 3.0 (Belkir *et al.*, 1996) et Biosys (Swofford et Selander, 1981; 1989). L'écart à l'équilibre panmictique de Hardy-Weinberg est testé au moyen du test de χ^2 et les fréquences alléliques obtenues permettent de calculer la divergence et l'identité génétique selon Nei (1972). La différence entre la fréquence de chaque allèle de chacune des trois populations et de l'ensemble des allèles de chaque locus étudié est mesuré par l'indice de fixation F_{st} (Wright, 1965) lequel est testé avec un χ^2 modifié selon Workman et Niswander (1970): $\chi^2 = 2N.F_{st}.(k-1)$, N étant l'effectif de la population et k le nombre d'allèles. La signification de la déviation de F_{is} (Wright, 1965) qui évalue les déficits ou excès en hétérozygotes au sein des populations est testée avec un $\chi^2 = N F_{is}^2.(k-1)$ (Workman et Niswander, 1970), N étant l'effectif de la population et k le nombre d'allèles.

RÉSULTATS

Les fréquences alléliques observées ainsi que les valeurs de F_{st} calculées sont mentionnées dans le tableau 1. Sur les neuf systèmes enzymatiques testés, trois ne sont pas retenus car ils présentent des zymogrammes trop diffus pour être interprétés, ce sont les hexokinases (Hk),

l'alpha-phosphogluconate déshydrogénase (α-Pgd) et l'aspartate amino transférase (Aat). Pour les six autres systèmes enzymatiques, deux loci sont détectés pour la leucine aminopeptidase (Lap), la malate déshydrogénase (Mdh) et l'isocitrate déshydrogénase (Idh). Un locus de l'Idh s'est révélé totalement monomorphe (Idh 2) pour les trois populations; les loci Lap 2 et Mdh 1 sont monomorphes (population du lac de Tunis) ou très faiblement polymorphes (populations de Bizerte et du canal de la Goulette). Cependant, aucun allèle ne fait l'exclusivité d'une population, sauf les allèles Lap 1^{96}, la Mdh 2^{90} et la Pgi ^{90} pour la population du lac de Tunis et le 6-Pgd ^{95} pour celle du canal de la Goulette.

Le tableau 2 présente les génotypes observés. La distribution des génotypes est significativement différente par rapport à l'équilibre de Hardy Weinberg aux loci Lap-1 et Idh 1 pour les trois populations, aux loci Lap-2, Pgm pour la population du canal. L'indice de diversité génique est pratiquement similaire pour les trois populations: de 0.317 à 0.337. Le taux de polymorphisme varie de 56% dans la station du canal, à 66.7% dans celle de Menzel-Jemil et à 77.8% dans le lac de Tunis (tableau 3). Le taux d'hétérozygotie calculé sur les loci polymorphes est plus élevé pour la population du lac de Tunis (0.434) que celui enregistré pour les deux autres populations qui sont respectivement de 0.356 (Menzel-Jemil) et de 0.360 (canal de la Goulette). Le taux d'hétérozygotie moyen par locus est de 0.337 (lac de Tunis), 0.321 (canal) et de 0.317 (Menzel Jemil) et le nombre moyen d'allèle par locus est respectivement de 2.89, 2.78 et 2.67. Les valeurs de χ^2 calculées (tableau 3) ont montré un déficit significatif en hétérozygotie enregistré pour le locus Lap-1 (populations de Menzel-Jemil et du lac de Tunis) et un excès en hétérozygotie relevé pour la Pgi (Menzel-Jemil et canal) et la Pgm (population du canal) (tableau 3).

DISCUSSION

Les résultats ainsi obtenus à partir des individus de *Ruditapes decussatus* prélevées dans trois milieux différents du nord de la Tunisie montrent qu'ils appartiennent à trois entités génétiquement très proches. Les valeurs très faibles de la distance de Nei, égale à 0.003 (entre canal et lac de Tunis), 0.002 (entre Menzel Jemil et canal) et 0 (entre Menzel Jemil et lac de Tunis) semblent être dues à un flux génique très important. La carte de courantologie (fig.4) réalisée par El Arrim (1996) montre que le courant général de la Méditerranée occidentale, orienté de l'est vers l'ouest, se scinde au niveau du golfe de Tunis en différentes branches. La première contourne l'isobathe 100m, la deuxième plonge avec une direction NNE SSW pour se briser près de Kourbous en deux autres branches dont l'une remonte vers le nord-est et l'autre vers le sud. La troisième contourne les côtes occidentales du golfe. Le sens de ces courants et des dérives littorales, associé aux courants de marées qui se font entre la Méditerranée, les milieux lacustres et le canal d'autre part, explique à notre avis le transport de larves planctoniques de la lagune de Bizerte aux deux autres milieux.

Cependant, nous avons signalé la présence de quelques allèles caractéristiques de deux populations notamment les allèles Lap 1^{96}, Mdh 2^{90} et Pgi ^{90} pour la population du lac de Tunis et 6 Pgd ^{95} pour celle du canal de la Goulette. En effet, bien que les valeurs de la température et de la salinité sont pratiquement similaires entre les trois milieux étudiés, il est très vraisemblable que d'autres facteurs comme le pH, le taux d'oxygène, la richesse du milieu en matière organique,la nature et concentration des polluants, etc... ou bien la conjonction de plusieurs facteurs influent sur l'expression de certains allèles.

Tableau 1. Fréquence allélique et résultats des tests de χ^2 et de F_{st}. N effectif, ddl nombre de degrés de liberté, P: probabilité (+ significatif au seuil α' (seuil corrigé selon Bonferroni), - non significatif).

Locus		population Menzel-Jemil	population du canal	population du lac	F_{st}
Lap-1	N	94	96	99	
	102	0.0904	0.0833	0.106	0.004 (-)
	100	0.84	0.854	0.757	0.012 (+)
	98	0.069	0.0625	0.126	0.009 (-)
	96	0	0	0.01	0.005 (-)
χ^2; ddl, P		21.1; 3; 0	15.41; 3; 0.001	14.49; 6; 0.025	
F_{st}; (test)			0.009 (+)		
Lap-2	N	98	100	98	
	102	0.026	0.015	0.031	0.0022 (-)
	100	0.959	0.98	0 944	0.004 (-)
	98	0.015	0.005	0 026	0.002 (-)
χ^2; ddl; P		0.155; 3; 0 985	15.41; 3, 0.01	0.313; 3; 0.957	
F_{st}; (test)			0.004 (-)		
Idh-1	N	98	97	98	
	105	0.117	0.134	0.173	0.0019 (-)
	100	0.724	0.784	0.684	0.0083 (-)
	95	0.158	0.082	0.143	0.009 (+)
χ^2; ddl; P		13.37; 3; 0.004	14.99; 3; 0.002	12.87; 3; 0.005	
F_{st}; (test)			0.008 (++)		
Mdh-2	N	99	100	100	
	100	0.939	0.965	0.93	0.0013 (-)
	95	0.061	0.035	0.065	0 0001 (-)
	90	0	0	0.005	0.00003 (-)
χ^2; ddl; P		0.376; 1; 0.54	0.112; 1; 0.738	1.13; 3; 0.771	
F_{st}; (test)			0 004 (-)		
Pgm	N	100	100	100	
	102	0.43	0.45	0.43	0.004 (-)
	100	0.57	0 55	0.57	0.004 (-)
χ^2; ddl; P		0.311; 1; 0.557	8.29; 1; 0.004	1 16; 1; 0.283	
F_{st}; (test)			0 004 (-)		
Pgi	N	100	100	100	
	105	0.145	0.19	0.17	0 001 (-)
	100	0.455	0.32	0.425	0.017 (+)
	95	0.4	0.49	0.39	0.008 (-)
	90	0	0	0.015	0.01 (+)
χ^2; ddl; P		6.63; 3; 0.085	6.66; 3; 0.083	8.99; 6; 0.174	
F_{st}; (test)			0.009 (+)		
6 Pgd	N	99	99	100	
	115	0.187	0.162	0.2	0.002 (-)
	110	0.121	0.096	0.14	0.00003 (-)
	105	0.369	0.374	0.33	0.0007 (-)
	100	0.283	0.328	0.285	0.0003 (-)
	98	0.04	0.015	0.045	0.01 (+)
	95	0	0.025	0	0.0023 (-)
χ^2; ddl; P		14.16; 10; 0.166	18.74; 15; 0.226	7.72; 10; 0.656	
F_{st}; (test)			0 002 (-)		

Tableau 2. Fréquences génotypiques effectivement observées (obs.) et indices de déviation calculés (ID).

Locus	génotype	Menzel-Jemil (obs.)	Canal (obs.)	Lac de Tunis (obs.)
Lap-1	102/102	2	0	2
	100/100	70	73	62
	98/98	3	2	5
	96/96	0	0	0
	102/100	12	13	13
	102/98	1	3	4
	102/96	0	0	0
	100/98	6	5	11
	100/96	0	0	2
	98/96	0	0	0
ID		-0.284	-0.162	-0.244
Lap-2	102/102	0	0	0
	100/100	90	97	87
	98/98	0	0	0
	102/100	5	2	6
	102/98	0	0	0
	100/98	3	1	5
ID		0 27	0.11	0.39
Idh-1	105/105	0	0	5
	100/100	50	58	41
	95/95	6	3	0
	105/100	23	26	24
	105/95	0	0	0
	100/95	19	10	28
ID		-0.23	0.22	0 95
Mdh-2	100/100	87	93	87
	95/95	0	0	1
	90/90	0	0	0
	100/95	12	7	11
	100/90	0	0	1
	95/90	0	0	0
ID		0.059	0.31	-0.083
Pgm	102/102	17	13	21
	100/100	31	23	35
	102/100	52	64	44
ID		0.055	0.286	-0.107

Locus	génotype	Menzel-Jemil (obs.)	Canal (obs.)	Lac de Tunis (obs.)
Pgi	105/105	1	2	3
	100/100	16	6	11
	95/95	10	18	13
	90/90	0	0	0
	105/100	13	12	19
	105/95	14	22	9
	105/90	0	0	0
	100/95	46	40	42
	100/90	0	0	2
	95/90	0	0	1
ID		0.187	0.185	0.198
6-Pgd	115/115	3	1	4
	110/110	0	1	1
	105/105	11	12	9
	100/100	9	7	6
	98/98	1	0	0
	95/95	0	0	0
	115/110	6	1	8
	115/105	18	9	15
	115/100	5	17	9
	115/98	2	1	0
	115/95	0	2	0
	110/105	8	11	7
	110/100	9	5	10
	110/98	1	0	1
	110/95	0	0	0
	105/100	23	27	22
	105/98	2	0	4
	105/95	0	3	0
	100/98	1	2	40
	100/95	0	0	0
	98/95	0	0	0
ID		0 029	0.094	0.064

Tableau 3. Paramètres de variabilité génétique au sein de chaque population (M. Menzel-Jemil, C canal, L lac de Tunis) pour les loci polymorphes (*: significatif au seuil α' - seuil corrigé selon Bonferroni).

Locus	% hétérozygotie (Menzel-Jemil)	F_{is} (M)	% hétérozygotie (Canal)	F_{is} (C)	% hétérozygotie (lac de Tunis)	F_{is} (L)
Mdh-1	0 202	-	0.202	-0.005	0.303	-
Mdh-2	0.082	-0 059	0.082	-0.031	0.112	0 088
Lap-1	0.43	0.285**	0.43	0.162	0.53	0.245**
Lap-2	0.01	-0.027	0.01	-0.011	-	-0.039
Idh-1	0.12	0.023	0.12	-0.022	0.12	-0.096
Pgm	0.52	-0.027	0.52	-0.203*	0.44	0.107
Pgi	0.73	-0.188*	0.73	-0.186*	0.73	-0.139
6Pgd	0.76	-0.041	0 76	-0.094	0.8	-0.064
Moy s		-0.0046 (0 08)		-0.049 (0.09)		0.0146 (0.09)
Moy	0 317		0.321		0 337	
Taux de polymorphisme	0.67		0.56		0.78	

Le taux de polymorphisme calculé présente une valeur moyenne de 66.83%, valeur moins élevée que celle relevée sur une population de la même espèce récoltée dans l'étang du Prévost (côte méditerranéenne française) par Worms et Pasteur (1982) et qui est de l'ordre de 83%. En revanche, cette valeur est beaucoup plus élevée que celle enregistrée, 41%, sur trois autres populations du Diben, du Tinduff et de l'Ile Tudy (côte atlantique bretonne) par Moraga (1983).

Le taux d'hétérozygotie moyen relevé dans les stations tunisiennes (0.325) est légèrement inférieur, 0 36, à celui trouvé par Borsa (1990) sur la même espèce. Par contre, il est supérieur aux taux enregistrés par Worms et Pasteur (1982) (0.277), par Jarne *et al.* (1988) (0.229 à 0.282) et par Moraga et Lucas (1983) (0.167) et chez d'autres espèces de bivalves comme *Tridacna maxima*: H= 0.22 (Ayala *et al.*, 1973), *Crassostrea gigas*: 0.21 (Buroker *et al.*, 1979) et *Saccostrea commercialis*: 0.18 (Buroker *et al.*, 1979). Cependant, la valeur relevée en Tunisie est proche de celle donnée par Denis (1995) (0 346) qui a travaillé sur la palourde *Ruditapes philippinarum* sur le littoral atlantique breton. L'excès significatif d'hétérozygotie enregistré en Tunisie pour l'espèce européenne peut être expliqué par une sélection éliminant les individus homozygotes.

En effet, la présence d'allèles à fréquence relativement importante dans une population donnée permet de la caractériser par rapport à d'autres populations présentant une fréquence nulle de ce même allèle. Les travaux effectués par Worms et Pasteur (1982) sur la même espèce prélevée dans l'étang du Prévost ont montré que les allèles Lap-2^{60} et Mdh 1^{75} caractérisent cette population et que ces alléles sont absents aussi bien en Bretagne: Bindy, Tinduff et l'Ile Tudy (Moraga et Lucas, 1983) qu'en Tunisie. S'agissant de l'allèle Pgi ^{90}, ce dernier se trouve absent dans les populations bretonnes et fait l'exclusivité de la population tunisienne. Il est à noter que

le même système enzymatique a été étudié sur la même espèce par Jarne *et al.* (1988) prélevée dans plusieurs stations françaises mais aussi dans le lac de Bizerte: les résultats obtenus par ces auteurs montrent que la Pgi de la population de Bizerte présente 6 allèles (en tenant compte uniquement des allèles à fréquence supérieure à 2%). Par contre, nos résultats révèlent pour le même système enzymatique 3 allèles seulement, ce qui signifierait la disparition de 50% des allèles entre 1988 et 1998.

Il sera intéressant d'élargir notre étude à des populations de classes de taille différentes, vivant éloignées sur le plan géographique, dans des conditions de milieu différentes de celle du nord de la Tunisie, comme par exemple le sud tunisien, milieux lagunaire et marin, où la température et la salinité peuvent atteindre respectivement les 32 à 35°C et 45 à 50 g/l. A ceci peut s'ajouter les effets de marées. Ces études pourraient être d'un grand intérêt pour nos connaissances sur la variabilité et la différenciation génétiques de l'espèce fréquentant les divers milieux de la côte tunisienne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

Aissa P , 1991. Ecologie des nématodes libres de la lagune de Bizerte. Dynamique et biocénotique. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Tunis II, Faculté des Sciences de Tunis. 370 p.

Ayala F. J , Hedgecock D., Zumwalt G. S. et Valentine J. W , 1973. Genetic variation in *Tridacna maxima*, and ecological analog of some unsuccessfull evolutionary lineages. *Evolution* **22** (2): 177-191.

Azouz A., 1966. Etude des peuplements et des possibilités d'ostréiculture du lac de Bizerte. *Annales, Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche de Salammbo* **15**: 1-70.

Belkir K , Borsa P , Goudet J et Bonhomme F , 1996 GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier, Montpellier.

Borsa P , 1990 Génétique des populations de bivalves en milieu lagunaire la palourde dans l'étang de Thau (Méditerranée). Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6. 147 p

Buroker N E , Hershberger W K. et Chew K. K , 1979. Population genetics of the family Ostreidae II Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Marine Biology* **54**(2): 157-169.

Carbonel P , Le Gigan P. H , Pujos M , Soubade A. M., Bobier C. et Jouirou M , 1985. Evolution du lac de Tunis, un modèle de passage d'un milieu littoral à un milieu lagunaire. *Actes du 1er Congrès National, Sciences de la Terre* (Tunis septembre. 1981) **2**: 91 99.

Chouba L , Zamouri N., El Abed A , 1998. Etat actuel de la pollution dans les ports de la région nord, essai de sa propagation sur l'écosystème littoral. *Rapports et Documents, INSTM* **2**: 1-28.

Denis F., 1995 Génétique biochimique et moléculaire de la palourde *Ruditapes philippinarum* (Mollusque, Bivalve). Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 145 p.

El Arrim A , 1996 Etude d'impact de la dynamique sédimentaire et des aménagements sur la stabilité du littoral du golfe de Tunis. Thèse de Doctorat de Spécialité, 203 p.

El Menif N., 1993. Essai d'un ensemencement de la palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) dans la lagune de Monastir (Tunisie). *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie* **22**: 23-27.

El Menif N , 1994 Note préliminaire sur la palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) des lagunes de Bizerte et de Monastir (Tunisie) *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie* **23** 54-56.

El Menif N., Le Pennec M et Maamouri F.,1995 La reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) (mollusque bivalve) sur les côtes tunisiennes. *Marine Life* **5**(1): 35-42.

El Menif N , Le Pennec M. et Maamouri F ,1996 Estimation de la fécondité et de la qualité des ovocytes émis par la palourde *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) lors d'inductions expérimentales *Archives de l'Institut Pasteur, Tunis* **73**(3/4). 205-210

El Menif N et Maamouri F , 1996. Croissance comparée de la palourde européenne *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) dans les milieux lagunaire et marin. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie* **25** 61-72

Khedir Z., Belayouni H., Saidane D. et Tritar B , 1998 Evaluation de la qualité de l'environnement dans le canal de navigation de Tunis *Communications, X^ème Journées Nationales de Biologie*, p. 6.

Jame P , Berren P et Guelorget O , 1988 Variabilité génétique et morphométrique de cinq populations de la palourde *Ruditapes decussatus* (Mollusque Bivalve). *Oceanologica Acta* **11**(4): 401-407.

Moraga D et Lucas A , 1983. Polymorphisme enzymatique de trois populations de palourdes (*Ruditapes decussatus* L) de Bretagne. Bases biologiques de l'aquaculture, IFREMER, *Actes de colloques IFREMER* **1** 139-150.

Nei M., 1972. Genetic distance between population. *American Naturalist* **106**: 283-292

Pasteur N., Pasteur G , Bonhomme F., Catalan J. et Britton-Davidian J , 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines . Lavoisier, Paris, 217 p.

Soussi N , 1981 Mécanismes de la sédimentation et évolution paléogéographique de la lagune de Bizerte (Tunisie) durant le Quaternaire récent Thèse de Doctorat de spécialité, Université de Toulouse: 229p

Swofford D L et Selander R B , 1981 BIOSYS-1. a computer program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *Journal of Heredity* **72**. 281-283.

Swofford D.L et Selander R B , 1989. BIOSYS-1 a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. User's manual. 43 p.

Vanberk A H et Oostinga H , 1992. North lake of Tunis and its Shores: Restoration and development *Terra et Aqua*. **49**: 23-32

Workman P. L et Niswander J D., 1970 Population studies on Southern Indian tribes II. Local genetic differenciation in the Papago. *American. Journal of Human Genetics* **22**: 24-49.

Worms J. et Pasteur N , 1982. Polymorphisme biochimique de la palourde, *Venerupis decussata*, de l'étang de Prévost (France). *Oceanologica Acta* **5**(4): 401-407.

Wright S , 1965. The interpretation of population structure by statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.

Zaouali J , 1977 Lac de Tunis facteurs climatiques, physico-chimiques et crises dystrophiques *Bulletin de l'Office National des Pêches*, Tunisie, 1: 37-49.

Zaouali J , 1984. Lac de Tunis. 3000 years of engineering and pollution, a bibliographical study with comments. *Marine Science, UNESCO Report*, 29: 30-41

Sur la forme typique de *Limicolaria kambeul* (Gastropoda, Achatinidae)

Jacques DAGET [1]

ABSTRACT

On the typical form of *Limicolaria kambeul* (Gastropoda, Achatinidae)

In the genus *Limicolaria*, the most early known species is *L. kambeul* (Bruguière, 1791). It was studied, described and figured by Adanson in 1757, and the specific name was made available by Bruguière in 1791. The type locality is Sali, Senegal. All specimens used by Adanson for the description were syntypes. One of these is still extant in the Museum national d'Histoire naturelle, Paris. A new description of the typical form of the species is given. The synonymy is discussed.

RÉSUMÉ

Dans le genre *Limicolaria*, l'espèce la plus anciennement connue est *L. kambeul*. Elle fut étudiée, décrite et figurée par Adanson en 1757 et le nom spécifique a été rendu disponible par Bruguière en 1791. Sa localité type est Sali, au Sénégal. Tous les exemplaires ayant servi à Adanson pour sa description étaient syntypes. L'un de ceux-ci existe encore au Muséum national d'Histoire naturelle de Paris. La forme typique de l'espèce est redécrite à partir d'exemplaires en provenance du Sénégal. Sa synonymie est discutée.

HISTORIQUE

Adanson en 1757 décrivit et figura le premier un *Cochlea kambeul*. Cette appellation binominale n'est pas disponible aux termes du Code international de Nomenclature zoologique puisqu'elle fut publiée en 1757. Linné ne cite cette espèce ni dans la 10e édition de son Systema Naturae (1758), ni dans la 12e édition (1766). Gmelin (1791) ne la mentionne pas non plus. Elle ne fut validée que par Bruguière (1791: 322, n° 40) dans les termes suivants: "*Bulimus kambeul Noh. Bulimus testa oblongo-ovata decussata alba, fuscostrigata, apertura basi coarctata. Noh.* Kambeul:

1 Laboratoire d'Ichtyologie générale et appliquée, MNHN, 43 rue Cuvier, F-75231 Paris cedex 05

Adanson conchyl, fig. 14, tab. 1, fig. 1, *fegina optima*". Il en résulte que Bruguière, faisant référence à la description et à la figure d'Adanson, tous les exemplaires utilisés par cet auteur étaient syntypes et que le lieu où ils ont été récoltés est la localité type de l'espèce. Adanson précise: "Il n'y a qu'une espèce au Sénégal... je ne l'ai trouvée que dans un seul endroit où elle était à la vérité fort commune, surtout pendant le mois de septembre. C'était dans une prairie assez aride, éloignée d'une petite demi-lieue de la mer, derrière le village de Portudal, que les nègres appellent autrement Sali, à neuf lieues environ dans le sud de l'île de Gorée". Ajoutons que Sali est situé à environ 8 km au nord-ouest de Mbour (approximativement 14°27' N et 17°02' W). Le mois de septembre y correspond à la saison des pluies et les *Limicolaria* restent enterrés durant la très longue saison sèche. Le but de la présente note est de retracer l'histoire assez complexe de ces types et de redonner une description plus complète de la forme typique de l'espèce.

Adanson (1727-1806) fut le premier naturaliste à séjourner sur le continent africain. Employé à la Compagnie des Indes, il demeura au Sénégal du 3 mars 1749 au 4 janvier 1754. Il profita de cette circonstance pour effectuer nombre d'observations originales sur la flore et la faune locales. Bien qu'il soit surtout renommé pour son oeuvre botanique, il s'est également illustré dans l'étude des Mollusques. Son "Histoire des Coquillages", parue en 1757 est un véritable traité de Malacologie. Cuvier dans l'éloge historique de Michel Adanson à la classe des Sciences mathématiques et physiques de l'Institut, dans la séance publique du 5 janvier 1807, reconnaissait que sa classification des Mollusques "était bien supérieure à toutes celles de ses prédécesseurs" (Flourens, 1834: 81). Tryon dans son Manual of Conchology (1880: 57) concluait "Adanson must be regarded as the founder of Malacology". Si le grand spécialiste des plantes africaines, Auguste Chevalier, avait de bonnes raisons pour déplorer "que l'oeuvre botanique d'Adanson n'ait pas eu un retentissement en rapport avec sa valeur, en malacologie, il en fut tout autrement. Adanson partout cité, partout glorifié, eut une très grande influence sur le développement de cette branche des sciences naturelles" (Fischer-Piette, 1942: 105, note infrapaginale).

Adanson fit oeuvre de novateur sur au moins deux points importants. Pour élaborer une classification générale, il considère comme insuffisantes les particularités de la coquille, "ce vide squelette, cette sèche dépouille, seul objet que nous présentent les cabinets" (1757: p. viii). Il juge indispensable de prendre en compte le plus grand nombre de caractères, y compris ceux qui sont fondés sur l'anatomie des parties molles. "Il y avait donc dans les coquillages quelque chose de plus à considérer que leurs coquilles: l'animal qui les habite devait nous guider dans nos arrangements méthodiques, lui seul devait nous servir de règle, puisqu'il en est la principale partie, celle qui donne à cette espèce de squelette extérieur, la forme, la grandeur, la dureté, les couleurs, enfin tous les accidents que nous y admirons (Ibid., p. x)".

En second lieu, comme l'a bien fait remarquer Fischer-Piette (1942: 104), Adanson fut le premier en Zoologie à créer et à employer une nomenclature rigoureuse et commode; sa méthode est binominale et précède d'un an la 10e édition du Systema Naturae". En général les noms génériques qu'il emploie sont latins et les noms spécifiques empruntés à la langue des Ouolofs utilisée au Sénégal. *Cochlea kambeul* en est un exemple. Adanson avait réuni une importante collection d'échantillons récoltés par lui-même au Sénégal et qu'il avait pu observer et dessiner vivants. Lorsqu'il fut rentré en France, il en fit deux lots. Il céda l'un au Jardin du Roi, dont l'intendant était alors M. de Buffon, et il garda l'autre dans son cabinet personnel. D'après

Lamy (1928: 314) le premier lot fut remis au Jardin du Roy en 1760 contre paiement d'une rente viagère. D'après une autre source (Monod, 1964: 503) "Adanson aurait reçu le 2 mai 1764 l'ordre de remettre la collection au Cabinet du Roi et aurait été payé le 29 juin 1765".

Le Catalogue des pièces remises au Cabinet du Roy, rédigé de la main d'Adanson et auquel Monod (1964: 503) fait référence en lui attribuant la cote erronée "Ms 2311", est conservé dans le fonds d'archives non classées de la Bibliothèque centrale du Muséum d'Histoire naturelle de Paris. On y trouve mentionnés 3 *Cochlea kambeul* sous les numéros 2,153 F, 2,153 G et 2,154 I. C'est certainement ce lot auquel Bruguière fait référence lorsqu'il écrit: "Les individus que j'ai sous les yeux, qui sont venus du cabinet de M. de Jussieu, à qui ils avaient été donnés par Adanson..." Il s'agit d'Antoine-Laurent de Jussieu (1748-1836) qui fut professeur au Muséum national d'Histoire naturelle de Paris de 1793 à 1836. A l'époque où écrivait Bruguière, il n'était que démonstrateur au Jardin du Roy. Ces exemplaires, comme tous les autres objets remis par Adanson au Jardin du Roy n'ont pu être retrouvés malgré les recherches effectuées. "Le lot royal a été totalement perdu, égaré en bloc, vraisemblablement sans avoir jamais été intégré aux autres collections. Cette perte s'est probablement produite avant le règne de Lamarck, car cet auteur, qui dans l'Histoire des Animaux sans vertèbres, cite beaucoup d'espèces d'Adanson, le fait dans des termes qui montrent qu'il n'avait pas les exemplaires entre les mains" (Fischer-Piette, 1942: 112). C'est ainsi que dans le volume VI (2), Lamarck (1822: 121), à propos de l'*Helix kambeul*, donne comme seul commentaire la mention "mon cabinet", c'est-à-dire sa collection personnelle et non "Mus. n^er^" comme il le fait pour les exemplaires existant à son époque dans les collections du Muséum. Il ajoute "Sénégal" pour la provenance et "2 pouces 10 lignes", soit environ 77 mm pour la taille.

Le second lot avait été conservé par Adanson et se trouvait dans le château de Balaine. En 1939, il fut remis au Muséum national d'Histoire naturelle de Paris (MNHN). Il comprend deux exemplaires réunis sous le nom de *L. kambeul*. Le plus grand (91 x 41 mm) porte de la main d'Adanson la mention "2152 *Koklea* 7 F *Kambeul* sénég. 10 spires". Cette indication prouve qu'il faisait partie de la série des syntypes. Il correspond bien à la description et à la figure données par Adanson auxquelles Bruguière a fait référence. L'autre porte une inscription en partie effacée dont on n'a pu déchiffrer que "9 spires". Rien ne prouve qu'il s'agisse d'un *L. kambeul*, car sa coquille est beaucoup plus élancée que ne le sont les *L. kambeul* de taille équivalente. Fischer-Piette (1942: 134) écrit à son sujet: "il appartient manifestement à la variété étroite à bandes étroites citée par Adanson p. 15", . Ce dernier auteur l'oppose à la variété de grande taille (*L. kambeul* typique) dans les termes suivants: "une fois plus petite que l'autre (52 x 21 mm) et beaucoup plus allongée proportionnellement à sa largeur; les bandes qui la colorent sont aussi moins serrées, mais plus foncées". Elle n'a été ni nommée, ni figurée par Adanson. Il s'agit d'un *L. aurora* (Jay, 1839), espèce assez communément rencontrée dans certaines parties du Sénégal, mais rien ne prouve qu'elle ait été récoltée à Sali en même temps que les *L. kambeul*. On sait qu'Adanson avait incorporé dans sa collection des coquilles qui lui avaient été données et qui se trouvaient mélangées à celles qu'il avait récoltées lui même. Il en résulte néanmoins que:

1) La description de Bruguière faisant référence à celle d'Adanson, tous les exemplaires utilisés par cet auteur étaient syntypes dont celui existant actuellement au MNHN de Paris.

2) La localité type est Sali (Sénégal). Crowley et Pain (1970: 44) sont dans l'erreur en déclarant: "Type locality: not designated; Cape Palmas here selected" et plus loin "the present location of the type of *L. kambeul* is unknown".

3) La forme typique, telle qu'on la rencontre au Sénégal, est de grande taille. Adanson (1757: 15) écrit en effet: "La coquille du Kambeul parvenu à son dernier période (sic) d'accroissement, a trois pouces et demi de longueur et un pouce et demi de largeur", soit environ 98 x 42 mm. Pilsbry (1904: 251) était donc dans l'erreur en écrivant: "The typical form of this species is the rather small West African race, such as the Cape Palmas specimen described above (55 x 27 mm) and figured in fig. 4 (pl. 24). Cet auteur appelle *L. kambeul* var. *adansoni* (Pfeiffer, 1842) la forme plus grande du Sénégal. Or *Bulimus adansonis* Pfeiffer, 1842 est un synonyme objectif de *B. kambeul* Bruguière, 1791 ou plus exactement un nom substitué fondé sur le même matériel type que *L. kambeul*.

Limicolaria kambeul (Bruguière, 1791)

Diagnose

Espèce de grande taille, atteignant et dépassant 100 mm de hauteur (maximum observé 104 mm pour le type de *L. bellamyi* Jousseaume, 1886 provenant du Haut-Sénégal et 106 mm pour le type de *L. africana* Reeve, 1848). Coquille ventrue, de forme globuleuse, le rapport hauteur totale/diamètre maximal varie relativement peu avec la taille et reste voisin de 2 en moyenne chez les adultes. Spire composée de 9 à 10 tours. Test paraissant lisse à l'oeil nu, mais à un fort grossissement les stries d'accroissement transversales sont recoupées par de fines stries longitudinales surtout visibles à la partie supérieure des derniers tours. Coloration typiquement formée de flammules irrégulières d'un jaune rougeâtre séparées par des zones blanchâtres, mais il existe des individus de coloration uniformément claire.

Matériel examiné

En collection au MNHN de Paris, provenant du Sénégal et de la partie du Mali à l'ouest de 3° W. Les échantillons provenant de cette région géographique représentent la forme typique. Ont donc été volontairement exclues de cette étude les populations de taille réduite provenant du Liberia, de la côte d'Ivoire, du Ghana ou du Bénin et que les auteurs ont attribuées également à *L. kambeul*, sans être absolument certains qu'il s'agisse bien de la même espèce.

1 ex. syntype de *Bulimus kambeul* Bruguière, 1791 (MNHN, coll. Adanson), Sali, Sénégal, 91 x 41 (H/D = 2,22).

1 ex. holotype de *Limicolaria bellamyi* Jousseaume, 1886 (p. 475, pl. XII, fig. 1) (MNHN, typothèque), Haut-Sénégal, (coll. Bellamy), 104 x 52 (H/D = 2,00).

1 ex déterminé *L. kambeul* (Jousseaume, 1886. 475), Haut-Sénégal (coll. Bellamy), 65 x 32 (H/D = 2,03).

1 ex. déterminé *L. africana* (Jousseaume, 1886. 475), Haut-Sénégal (coll. Bellamy), 97 x 45 (H/D = 2,16)

2 ex. non déterminés, Sénégal, (ex coll. Géologie de la Sorbonne, coll. Muller), 87 x 43 et 75 x 36 (H/D = 2,02 et 2,05).

2 ex. déterminés *L. adansoni*, Casamance, (coll. Denis, 1845), 78 x 39 et 65 x 32 (H/D = 2,00 et 2,03).

1 ex. déterminé *L. adansoni*, Casamance?, (coll. Denis 1845), 79 x 38 (H/D = 2,08).

2 ex. déterminés *L. adansoni*, Sénégal, (coll Soyer, 1969), 83 x 40 et 69 x 34 (H/D – 2,08 et 2,03).

1 ex., déterminé *L. kambeul*, Koulikoro (Mali), (coll. ?) , 88 x 42 (H/D = 2,09)

3 ex déterminés *L. kambeul*, Sénégal, (coll Heudelot), 52 x 24, 50 x 23, 45 x 21 (H/D = 2,16, 2,17, 2,14).

1 ex. déterminé *L. kambeul*, Sénégal, (coll. Heudelot), 45 x 21 (H/D = 2,14).

6 ex déterminés *L. kambeul*, Sénégal (coll Heudelot), 85 x 41, 68 x 32, 58 x 29, 49 x 24, 43 x 23, 29 x 17 (H/D = 2,08, 2,13, 2,00, 2,04, 1,87, 1,79).

1 ex. déterminé *L. kambeul*, Sénégal, (coll. ?), 45 x 20 (H/D = 2,25)

2 ex. déterminés *L. kambeul*, Sénégal (coll. de Trentinian), 38 x 21, 29 x 18 (H/D – 1,81, 1,61)

1 ex. déterminé *L. kambeul*, Sénégal (coll. de Trentinian), 31 x 17 (H/D = 1,82).

1 ex. déterminé *L. kambeul*, Faguibine, Mali (coll Chevalier, 1900), 46 x 24 (H/D = 1,92).

1 ex. déterminé *L. kambeul*, Sénégal (coll. Letellier, 1949), 70 x 39 (H/D = 1,79).

2 ex. déterminés *L. kambeul*, Sénégal (coll. Staadt, 1969), 59 x 30 et 50 x 24 (H/D = 1,97 et 2,08).

2 ex. déterminés *L. kambeul*, Casamance (coll. Bouchet), 67 x 32 et 56 x 28 (H/D = 2,10 et 2,00).

DESCRIPTION

Espèce de grande taille, dont la coquille des adultes présente environ 9-10 tours de spire, peut atteindre ou même dépasser 100 mm de hauteur totale (Maximum observé 104 mm pour le type de *L. bellamyi* et même 106 mm pour le type de *L. africana*). Test apparemment lisse, mais au dernier tour, à un fort grossissement, on peut observer de fines stries verticales recoupées par des lignes spirales plus ou moins nettes selon les individus. Comme chez tous les *Limicolaria*, le diamètre maximal varie avec la taille de sorte qu'une seule valeur moyenne pour le rapport H/D ne peut être utilisée pour caractériser l'espèce. Sur l'échantillon constituant le matériel étudié, comprenant 32 individus de 29 à 104 mm de hauteur totale, la relation d'hétérochronie, en logarithmes népériens s'écrit:

$$\text{Log H} = 0{,}394 + 1{,}091 \text{ Log D} \qquad (1)$$

avec un coefficient de corrélation linéaire $r^2 = 0{,}959$. La relation entre H et D sous la forme ci dessus permet de comparer facilement les espèces, dans la mesure où les échantillons sont représentatifs et d'effectifs suffisants pour que les résultats soient statistiquement valables, alors que les diagrammes en H et D sont difficilement superposables et deviennent illisibles lorsque le nombre de points représentatifs est élevé. La valeur de r^2 mesure l'homogénéité de l'échantillon, elle est d'autant plus voisine de 1 que la dispersion des points autour de la droite de régression est plus faible. La relation (1) donne pour les hauteurs totales de 25, 50, 75 et 100 mm des valeurs moyennes du rapport H/D de 1,88, 1,99, 1,06 et 2,10 L'augmentation avec la taille est significative, mais relativement faible par comparaison avec d'autres espèces de *Limicolaria*. Par exemple sur un échantillon de 19 individus mesurant de 40 à 102 mm de hauteur totale et provenant des environs de Fort Lamy (actuellement N'Djamena) au Tchad (coll. pers.), la relation entre L et D s'écrit en logarithmes népériens:

$$\text{Log H} = - 0{,}145 + 1{,}234 \text{ Log D} \qquad (2)$$

avec un coefficient de corrélation linéaire $r^2 = 0,965$. Cette relation (2) est nettement différente de la relation (1) ce qui confirme qu'il s'agit bien de deux espèces distinctes. Or Germain l'appelait *L. turriformis* alors que d'autres auteurs ne la distinguaient pas de *L. kambeul*. La relation (2) donne pour les hauteurs totales de 25, 50, 75 et 100 mm des valeurs du rapport H/D de 1,90, 2,16, 2,33 et 2,46.

Fig. 1. A gauche, syntype de *Limicolaria kambeul* (MNHN, coll. Adanson) provenant de Sali, Sénégal. Taille réelle 91 mm de hauteur. Au centre *Limicolaria aurora* (*L. kambeul* var. a d'Adanson) provenant de la collection Adanson (MNHN). Taille réelle 52 mm. A droite, *Limicolaria turriformis* (coll. pers.) provenant des environs de N'Djamena (ex Fort-Lamy), Tchad. Taille réelle 96 mm (Clichés Métivier, MNHN, laboratoire de Malacologie).

La figure 2 montre que les *L. turriformis* du Tchad, comparés aux *L. kambeul* typiques ont des coquilles nettement moins ventrues. La différence est particulièrement nette aux grandes tailles. En revanche, pour les faibles tailles, compte tenu de la variabilité individuelle des rapports H/D, les deux espèces pourraient, sur ce critère, être facilement confondues. Cela pourrait expliquer que dans une même localité, des *L. turriformis* de petite taille aient été déterminés comme étant des *L. kambeul*. La coloration est variable, elle comporte habituellement des bandes verticales irrégulières brun rougeâtre, plus ou moins foncées sur fond clair. Mais ces bandes, souvent qualifiées de flammules, s'estompent et même disparaissent totalement chez certains

individus dont le test est uniformément jaune paille. Un polymorphisme de coloration identique est bien connu chez d'autres *Limicolaria*, par exemple *L. aurora*. D'après Dautzenberg (1890: 130, pl. I, fig. 6 a-b) les oeufs de *L. kambeul* "sont blancs, globuleux, parfois un peu irréguliers, et mesurent 6 millimètres de diamètre. La coquille au moment de l'éclosion se compose de 3 tours de spire". Des données succinctes sur l'anatomie ont été publiées par Lehman (1864: 48, fig. 3) d'après un *Bulimus (Limicolaria) adansoni* provenant des îles du Cap Vert. L'anatomie du tractus génital a été décrit par Mead (1950: 250, pl. 5, fig. 26 et 30) d'après des exemplaires du Ghana dits "typical specimens", mais qui devaient appartenir en réalité à la forme de petite taille.

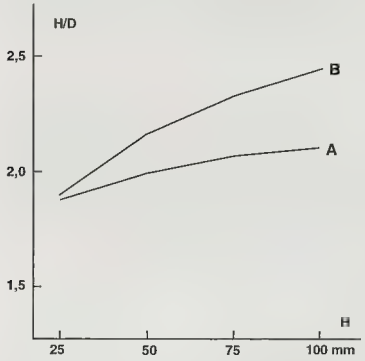

Fig 2. Augmentation du rapport Hauteur/Diamètre en fonction de la taille chez *Limicolaria kambeul*, forme typique (A) et chez *Limicolaria turriformis* (B)

Synonymie et répartition géographique

En 1821, d'Audebard de Férussac dans ses "Tableaux systématiques des Animaux Mollusques" (p. 53, n° 390) mentionne un *Helix (Cochlogena) aedilis* et ajoute: "Habit. Le royaume de Galam en Afrique (c'est à dire la région de Bakel au Sénégal) Muséum n° 214". Il s'agissait d'un *nomen nudum*. Dans l'"Histoire naturelle générale et particulière des Mollusques terrestres et fluviatiles" Ferussac et Deshayes (1822, vol. II. 109 et Atlas, pl. 141 A, fig. 1, 4, 5) mettent cette espèce dans la synonymie de *L. kambeul*.. L'exemplaire représenté, holotype de *Limicolaria aedilis* mesurait 73 x 37 mm (H/D = 1,97). Il n'a pas été retrouvé dans la collection Férussac conservée au MNHN. H.Chevallier (1966) ne cite aucun *Limicolaria* dans son "Catalogue des collections du Muséum correspondant à l'"Histoire naturelle des Mollusques" de Férussac"

En 1842, L.Pfeiffer dans "Symbolae ad Historiam Heliceatum (sectio altera)" cite à la page 110 *Bulimus Adansoni* comme nom substitué pour le Kambeul d'Adanson, le génitif d'un nom propre latinisé lui paraissant plus conforme à l'esprit de la nomenclature linnéenne qu'un nom barbare en apposition.

En 1848, L.A.Reeve, dans "Conchologia Iconica" (vol. V, pl. L, n° 327-328), cite *Bulimus Kambeul* Bruguière et *Cochlogena aedulis* Férussac dans la synonymie de *Bulimus Adansoni* auquel il assigne comme habitat "West coast of Africa". De même provenance, il décrit comme espèce distincte un *Bulimus africanus* (pl. L, n° 330) dont l'holotype figuré mesure 106 x 56 mm (H/D = 1,89). Il s'agit toujours de la même espèce.

En 1886, F. Jousseaume dans "Coquilles du Haut-Sénégal" (p. 175, pl. XII, fig. 1) décrit un *Limicolaria Bellangi*. L'holotype provient de la région du Haut-Sénégal, localité peu précise puisqu'elle "s'étend. de Médine à l'ouest jusqu'au-delà de Bamakou à l'est, du 9°5 au 14° de longitude S., et du 12°5 au 14° de latitude, sur une étendue d'environ 600 kilomètres de l'E. à l'O". Cette coquille, récoltée morte et blanchie, se trouve dans la typothèque du MNHN. Jousseaume distingue cette espèce de *L. africana* et *L. kambeul* récoltés dans la même région, mais il s'agit bien d'une seule et même espèce.

D'autres synonymies ont été proposées, notamment par Crowley et Pain (1970: 45), qui demanderaient confirmation. Il en est de même des nombreuses localités citées dans la littérature pour *L. kambeul* en Afrique de l'Ouest ainsi que dans la boucle du Niger et le bassin tchadien où cette espèce serait sympatrique avec une ou plusieurs espèce(s) également de grande taille.que Germain rapportait à *L. turriformis* Martens, 1895 et à *L. turris* Pfeiffer 1861. *L. turriformis* a été décrit d'après deux syntypes provenant de "Kawirondo und Usaga, im Nordosten und Northern des Victoria Nyanza", c'est-à dire de l'Ouganda ou du Kenya. Ils mesurent 89 x 35 mm (H/D = 2,54) et 93 x 41 mm (H/D = 2,27). A cette espèce et à un certain nombre de variétés qu'il a distinguées, Germain (1906) rapportait les exemplaires vivant communément au Tchad. L'échantillon de 19 exemplaires dont il a été question plus haut ont été récoltés aux environs de Fort Lamy (actuellement N'Djamena) en sympatrie avec des *Burtoa nilotica* (Pfeiffer, 1861) dont les types provenaient de la même région que ceux de *L. turris*.

L. turris a été décrit d'après un exemplaire provenant des sources du Nil Blanc, "Ad fontes Nili Albi", mais plus probablement de la Dyur River au Sudan (Crowley et Pain, 1970: 36). Ce type mesure 114 x 43 mm (H/D = 2,65). Les dimensions données dans la description originale, 114 x 13, manifestement erronées ont été corrigées ultérieurement par Pfeiffer en 1866. Cette espèce est facilement identifiable par sa sculpture très accusée et bien visible à l'oeil nu. Ce caractère n'existe pas chez la plupart des *Limicolaria* vivant sur les rives du Bas Chari et aux alentours du lac Tchad. En revanche, il est bien visible sur les figures de *L. schubotzi* Bottger, 1927 dont le type et seul exemplaire provenant de Fort-Archambault, dans le sud du Tchad, avait été déposé dans le musée de Hambourg et a été détruit par un bombardement en 1943 (Crowley et Pain, 1970: 38). Il est également bien visible sur certains *L. turris* signalés sous le nom de *L. turris* var. *Desperthuisi* par Germain (1906: 168) en provenance du Tchad. L'un de ces exemplaires provient du Kanem et mesure 123 x 50 (H/D = 2,46), l'autre "du pays de Corbol entre le lac Iro et le Moyen Chari" et mesure 129,5 x 55 (H/D = 2,35). Germain (1933) signale des *L. turris* jusque sur les rives du Niger à Gao (0°09'W, 16°19' N), localité qui marquerait la limite d'extension de cette espèce vers l'ouest à cette latitude.

Clé de détermination; tentative pour les espèces de grande taille (pouvant atteindre ou dépasser 100 mm de hauteur totale), susceptibles d'être rencontrées dans le nord de l'Afrique de l'Ouest et au Tchad

- 1 Test très nettement sculpté par des stries verticales recoupant des lignes spirales, espèce signalée à l'est du 3° W ..... *L.turris*
- 2. Test apparemment lisse, des stries verticales et des lignes spirales n'étant visibles qu'à un fort grossissement 3-4
- 3. Formes élancées, H/D moyen nettement supérieur à 2 chez les adultes, espèce signalée à l'est du 3°W ..... *L.turriformis*
- 4. Formes ventrues, H/D moyen peu différent de 2 chez les adultes, seule espèce rencontrée à l'ouest de 3° W ..... *L. kambeul*

REMERCIEMENTS

Je remercie le personnel du Laboratoire de Malacologie et principalement MM. les Pr Ph. Bouchet et B. Métivier pour les conseils et les critiques constructives qu'il m'ont prodigués ainsi que M. Thierry Oberdorff pour le calcul des relations logarithmiques..

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adanson M., 1757. Histoire des Coquillages. xcvi + 275 p., 19 pl. Bauche, Paris.

Bruguiere J G , 1791 Encyclopédie méthodique. Histoire naturelle des Vers 757 p Panckouke, Paris.

Chevallier H., 1966 Catalogue des collections du Muséum correspondant à l'"Histoire naturelle des Mollusques" de Férussac (5e partie) *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle,* Paris, **30**(5). 669-682.

Crowley T E & Pain T , 1970 A monograph revision of the African Land snails of the genus *Limicolaria. Annales du Musée Royal d'Afrique Centrale* (Sciences zoologiques) **177**. 59 p , 6 pl.

Dautzenberg P , 1890 Récoltes malacologiques de M le Capitaine Em Dorr dans le Haut Sénégal et le Soudan français de 1886 à 1889. *Mémoires de la Société Zoologique de France* **3**: 128-135, 1 pl

Ferussac A.E.J.P J F. d'Audebard de, 1821. Tableaux systématiques des Animaux mollusques xlvii + 111 p. Paris.

Férussac A.E J P J.F , d'Audebard de, 1822 Histoire naturelle générale et particulière des Mollusques terrestres et fluviatiles (complétée par G.P. Deshayes). 2 vol de texte de 400 p chacun et 2 vol d'Atlas de 247 pl. Paris.

Fischer Piette E , 1942 Les Mollusques d'Adanson. *Journal de Conchyliologe* **75**: 103 377 , 16 pl.

Flourens P.J M., 1834. Cuvier, Eloges historiques, Paris, 356 p. (Eloge de Michel Adanson· 69-99)

Germain L., 1906. Sur les Mollusques recueillis par M le capitaine Duperthuis dans la région du Kanem (lac Tchad). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle,* Paris, **12**(3): 166-175, 2 fig.

Germain L; 1933 Mollusques terrestres et fluviatiles de l'Afrique Occidentale Française (Mission A. Chevalier, 1931-32). *Bulletin du Comité d'Etudes Historiques et Scientifiques de l'Afrique Occidentale Française* **16**(2): 169-236, 8 fig

Jousseaume F , 1886. Coquilles du Haut Sénégal. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **11**: 471 502, 2 pl.

Lamarck J B., 1822. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres vol 6(2). 232 p. A. Belin, Paris.

Lamy E., 1928 Note sur la collection conchyliologique d'Adanson. *Journal de Conchyliologie* **72** 311-316

Lehman [R], 1864. Untersuchung einiger Schneckenthiere. *Malakozoologische Blatter* **11** 44-51, 1 pl., 4 fig

Martens E. von, 1895. Neue Land- une Susswasser Schnecken aus Ost Afrika. *Nachrichtsblatt der Deutsches Malakozoologischen Gesellschaft* **1895**(11-12): 175-181

Mead A R , 1950. Comparative genital anatomy of some Achatinidae (Pulmonata). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology,* Cambridge U.S.A., **105**(2): 118-291, 9 pl

Monod T., 1964. L'oeuvre zoologique d'Adanson: 499-527, fig. 39-43. *In:* The bicentennial of Michel Adanson's "Familles des Plantes" Part two. Carnegie Institute of Technology, Pittsburgh, Pensylvania, 635 p., 48 fig.

Pfeiffer L., 1842. Symbolae ad Historiam Heliceorum, vol. 2, 147 p. Cassel.

Pfeiffer L , 1861. Description of forty seven new species of Land-shells from the collection of H Cuming Esq. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1861**: 20-29, pl. II-III.

Pfeiffer L., 1866. Novitates Conchologicae, ser 1a, Mollusca extramarina. pp. 139-303, pl XXXVII LXXII. Cassel.

Pilsbry H.A., 1904. Manual of Conchology, 2nd ser., 16: 329 p., 37 pl. Philadelphia

Reeve L.A., 1848. Monograph of the genus *Bulimus*. *In* Conchologia Iconica, V, 662 sp , 89 pl London.

Tryon G.W., 1880. Manual of Conchology, 1st ser., vol. 2: 289 p., 70 pl. Philadelphia.

Effects of heavy metal exposure on ionic composition of fluids and nacre of *Anodonta cygnea* (Unionidae)

*Gabriela MOURA [1], Maria J. ALMEIDA [1], Maria J.C. MACHADO [2] and Jorge MACHADO [1,3]**

RÉSUMÉ

Effets des métaux lourds sur la composition ionique dans les fluides et dans la nacre d'*Anodonta cygnea* (Unionidae)

Les mollusques bivalves sont connus pour avoir des tendances particulières en ce qui concerne leur réponse face au stress des métaux lourds. Dans ce travail, des spécimens du bivalve d'eau douce *Anodonta cygnea* ont été incubés avec quelques métaux lourds: Cd, Cu, Cr, Zn, et Pb. Après cela, nous avons étudié la composition ionique des fluides biologiques, hémolymphe et fluide extrapalléal; et celle de la nacre récemment formée.

Les résultats ont permis de conclure que le Cd est le seul métal lourd qui soit hautement augmenté dans les fluides, en réponse à une exposition intense, tandis qu'aucun des autres, i.e. Cu, Cr, Pb, ou Zn, n'a montré des résultats significativement plus élevés, soit par suite d'un isolement effectif, soit par suite d'une régulation interne efficace. L'exposition des animaux au Zn, un métal lourd essentiel, a montré une décroissance effective de la concentration de Zn dans les fluides, par rapport au contrôle. Le Zn et, particulièrement, le Pb, semblent être les métaux qui perturbent le plus l'équilibre ionique de ces animaux, provoquant une diminution générale de tous les ions principaux normalement présents. L'augmentation de la concentration du calcium en présence de Cu et Cd peut être due à une induction d'acidose conduisant à une formation anormale de la coquille.

[1] Laboratório de Fisiologia Aplicada, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Lg. Prof. Abel Salazar, 2. P-4099-003 Porto, Portugal

[2] Núcleo de Caracterização Química, Instituto Geológico e Mineiro. S. Mamede de Infesta, Portugal

[3] Centro de Investigação Marítima e Ambiental (CIMAR). Porto, Portugal.

* Corresponding author. E-mail. jmachado@icbas.up.pt.

La composition inorganique des couches internes de ces coquilles a révélé une tendance générale vers des quantités de métaux plus élevées dans tous les animaux exposés à la pollution, avec une accumulation de Cu et de Pb en présence d'une contamination par ces éléments. Cd, Zn et Cr ne sont pas significativement augmentés dans les coquilles des animaux contaminés.

ABSTRACT

Bivalve molluscs are known to have particular trends with respect to their response to heavy metal stress. In the present work, specimens of the freshwater clam *Anodonta cygnea* were incubated with several heavy metals Cd, Cu, Cr, Zn, and Pb. Afterwards, we studied the ionic composition of biological fluids, haemolymph and extrapallial fluid, and of recently formed nacre.

The results allow to conclude that Cd is the only heavy metal to be highly increased in the fluids, in response to an intense exposure, since none of the others, i.e. Cu, Cr, Pb, or Zn yielded significantly increased concentrations, either due to an effective isolation or to efficient internal regulation. Zn, an essential metal, was actually decreased in the fluids of animals exposed to it, in comparison to the control. Zn, and particularly Pb, seem to be the most disturbing metals for the ionic balance of these animals, causing an overall decrease of all major ions usually present. The increase of calcium contents namely with Cu and Cd incubation may be due to the acidosis induction which can create abnormal conditions for shell formation.

The inorganic composition of the nacreous inner layers from these shells revealed a general tendency for higher metal amounts in all pollutant exposed animals, together with Cu and Pb accumulation under respective contamination. Cd, Zn and Cr were not significantly increased in the shells of contaminated animals.

INTRODUCTION

Analyses of molluscan fluids are rare, because of the low volumes usually collected and analytical difficulties. However, when determinations of trace metals such as Mg, Sr, Cd, Zn, Fe and Mn were performed, these ions occurred at much higher concentrations in the extrapallial fluids of marine and freshwater molluscs than in the surrounding water (Wada and Fujinuki, 1976). On the other hand, bivalves can accumulate elements in valve margins during shell formation (Carriker *et al.*, 1980; Simkiss, 1983; Lingard *et al.*, 1992). The different elemental composition of the shell in each species can be due to: (1) the distinct mineralogical nature of the shell (Dodd, 1963); (2) the environmental differences in salinity, temperature and pressure of each habitat (Lerman, 1965; Pilkey and Hower, 1960); and (3) the environmental concentration of the elements that can be incorporated into the mineral, through isomorph substitution (Auerheimer *et al.*, 1984).

As usually accepted for all carbonate shell molluscs, the extrapallial fluid contains all components for biomineralization (Ca^{2+}, HCO_3^{2-}, organic molecules). On the other hand, and according to Wada and Fujinuki (1976), it can also contain heavy metals, if they are present in the outer medium (Puente *et al.*, 1996). Therefore, the extrapallial fluid must be somehow regulated in their ionic composition, in order to avoid the effects of potential crystal modifiers and poisons (Simkiss, 1965).

Within the same species, different elemental compositions of the shell have been mainly related to the respective environmental status, thus yielding a good number of comparative studies, using either marine or freshwater bivalve species (Manly and George, 1977). As a consequence, analyses for the metals Ag, Al, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr, and Zn are available for a wide range of molluscan

shells (Segar *et al.*, 1971; Carriker *et al.*, 1980). Segar *et al.* (1971) reports the ionic composition of the entire shell from several bivalve molluscs, including *Anodonta* sp.

We now report the results on the ionic composition of haemolymph and extrapallial fluids after heavy metals exposure (Pb, Zn, Cr, Cu, Fe and Cd). The goal is mainly to determine the preferential accumulation site for each heavy metal either in the fluids or in the shell compartment. Eventual alterations of major elements such as Na, K, Ca, Mg and Mn were also estimated in order to related with osmotic regulation mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Handling of animals

Anodonta cygnea mussels were collected through dredging from the clay bottom of Mira lagoon (Aveiro, Portugal). An experimental procedure identical to that used in Moura *et al.* (2000) was carried out in the present work.

Twelve specimens of about 200 g body weight were randomly selected to each treatment category, and kept in plastic tanks with circulating natural pond water. Tanks were placed in relative darkness, to simulate natural conditions, and the water was aerated and used in the tanks without any pretreatment.

Exposure was performed as follows: (1) a control group bathed only in natural pond water; (2) animals placed in five tanks where, once every two days, 10^{-6} M of each chosen metal was added. These were: copper as $CuSO_4$, zinc as $ZnSO_4$, cadmium as $CdCl_2$, lead as PbCl, and chromium as CrCl. Each exposure period lasted for one day, during which the circulation was interrupted.

All the metals were added to the tank water from a stock solution previously prepared with distilled water. These heavy metals were selected because they allow comparison of essential-nonessential elements.

An 8-month experimental period was chosen, to allow some shell growth and the consequent pollutant effect to be detectable (Palmer, 1983). The long period chosen for the incubations allowed some growth of new shell, under the respective influence of each pollutant agent.

During the exposure period daily observations were made to ensure that all animals were alive and siphoning normally. Mortality was zero in all tanks, except for two dead specimens collected in the Cd exposure tank, at the end of the whole experimental period.

For haemolymph and extrapallial fluids sample collection, animals were considered healthy if they showed active ventilation and powerful valve closing or water ejection upon disturbance and if their nacre presented a smooth and shiny look, with no deformities or anomalies of morphology.

Collection of liquid samples

The extrapallial fluid (20-30 ml) was withdrawn by prying open the valves (1-2cm) with a knife, making a tiny hole by separating some pallial muscle from the inner shell surface, and inserting through this hole a 0.8 x 40 mm needle between the shell and the mantle edge into the

central extrapallial compartment, collecting its fluid with gentle suction in a sterile 10 ml syringe. During this procedure care was taken that the needle tip was always in contact with the inner shell surface, avoiding contamination by extraneous water or other body fluids. Haemolymph samples (20-30 ml) were taken with a 0.8 x 40 mm needle attached to a sterile 10 ml syringe, inserted between valves across the mantle inner layer and into the mantle compartment. Liquid samples were kept on ice during collection, and left to rest for 1 to 2 hours. Afterwards, the fluids were transferred to new vials, closed off, and stored at 4°C or frozen at -70°C until further treatment.

Isolation of nacre samples

After the animals were sacrificed, the respective shells were liberated from their soft parts, brushed and cleaned on the exterior side, rinsed several times with distilled water, dried at room temperature and stored.

Before analysis, shell inner surfaces were washed with 0.2% NaOH to remove residual adhering organic matter, rinsed thoroughly in tap water and rinsed again in de-ionized distilled water. Then, the shells were dried at 50°C to constant weight (overnight) and weighed.

The nacre considered here is from the region bordered by the line of attachment of pallial muscles, the adductor muscles and the ligament. Shell nacre was decalcified over 6 hours at room temperature placing the valves on sand trays with their nacre facing upwards with 10 ml of 5% nitric acid into them, allowing for decalcification until complete stop of dissolution. By that time a sheet of organic membranes, forming a gelatinous-like substance, could be removed. All this material was brushed from the inner shell and treated together with the decalcifying medium, as well as the de-ionized and distilled water used to wash the whole decalcified zone.

For sample digestion, a nitric acid/de-ionized distilled water solution (5/2) was added to each sample-containing beaker and boiled until complete dryness. This step was performed twice. Additional solution was added and the samples boiled until approximately 5 ml remained. When cool, each sample was transferred to an acid-washed balloon and diluted as necessary for analyses. This kind of hot acid treatment was already tested by several authors, being considered efficient for the recovery of all metals to be measured (Butler and Timperley, 1996).

Analytical procedures

Measurement of each component of interest was made on six animals for each group, with a parallel treatment of the three sample-types described: extrapallial fluid, haemolymph, and nacre.

Osmotic concentration was measured in liquid samples at the collection day, using an osmometer (Advanced Micro-Osmometer model 3MO Plus) with a reading accuracy of ± 2 mOsm.

Calcium ions were measured by atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer 5000) with air acetylene flame for liquid samples, and flame photometry (Jenway PFP 7) for shell material. Flame photometry was also used for Na and K readings in all samples. All other metals were measured through atomic absorption spectrophotometry. Apart from calcium readings in the fluids, for which the standard addition method was used to correct for matrix effects (Usero

et al., 1996), the samples were all diluted with acidified water (1.5 ml HNO_2 l^{-1} H_2O), according to the ion to be red and the instruments' sensitivity.

Both atomic absorption and flame photometry standard solutions were diluted from the corresponding 1000 mg l^{-1} solution (Spectrosol BDH Chemicals). Absorbance curves were drawn based on instrument readings.

Some of the ionic readings were tested within the shell using an x ray microprobe For the analysis, each shell was cut with a diamond saw, from the umbonal region to the ventral margin, thus perpendicular to the winter lines, and thin sections were mounted in Araldite glue. Polished vertical shell sections were analyzed with a Camebax x-ray microprobe operating at 15 kV and 20 nA beam current. Spot measurements were performed with a 10 μm wide microprobe beam, which was programmed to measure Ca, Na, Zn and Mn, because these ions are the major expected constituents of the shell carbonates in this species. Fifteen measurements from six shells collected in four different months (January, April, August and October) were performed. Quantification was done by standardization against curves obtained by probing minerals with known concentrations of the elements to be read.

To evaluate the whole reading process, Lyphochek® standards were used as control samples for quality determination, presenting a matrix similar to that of analyzed samples. Assayed Chemistry Control C-310-5 and C 315-5 levels for Na, K, and Ca, and Urine Metals Control 4001 and 4051 levels for Mg, and Zn. Good agreement between the measured values and the recommended ranges was obtained.

Statistics

Differences between haemolymph and extrapallial fluid results were determined with t-tests for dependent samples. Differences between experimental groups were firstly tested for statistical significance by a one-way analysis of variance (ANOVA) with fixed effects, and when significant differences were detected post hoc comparison analyses were performed using the Scheffé test. Normal distribution of data was controlled using Kolmogorov-Smirnov tests, homogeneity of variances using Levene's test, and the independence of variance by normal probability plot of residuals. Outliers were substituted by the most extreme value of the respective group. Still, both iron and magnesium data in the fluids had to be logarithmized ($\log(x+1)$) in order to fulfill ANOVA conditions.

The significance level for all statistical analyses was set at 0.05. The liquid sample results are reported as mM or μM. All nacre ionic composition results are given in relation to the shell weight used, found by the weight difference between the whole untreated shells and the one after partial decalcification. All data are reported as means ($n=6$) ± standard deviations.

RESULTS

Biological fluids

In general, both haemolymph and extrapallial fluid presented similar profiles in the two compartments considered for all experimental groups (Fig. 1). The experimental situations resulted in an average increase of individual variability of results when compared with the control values. This situation is well expressed in the respective graphics (Fig. 1), the one of calcium fluid

levels being perhaps the most illustrative. This was also reported by Sturesson (1978), who stated that deviations would become larger the higher the contaminant concentrations. In the present results, the lowest calcium values are reached by the haemolymph of lead-polluted animals, while the highest are caused by the copper metal in extrapallial fluid. Sodium results showed a significantly lower concentration in both fluids of the animals incubated with lead. Potassium, iron and zinc averages indicated a trend to reach lower values at lead incubation too, in haemolymph, extrapallial fluids and in both, respectively. Cadmium levels were rather regular, but with the significant higher concentration of this metal being reached in cadmium-exposed

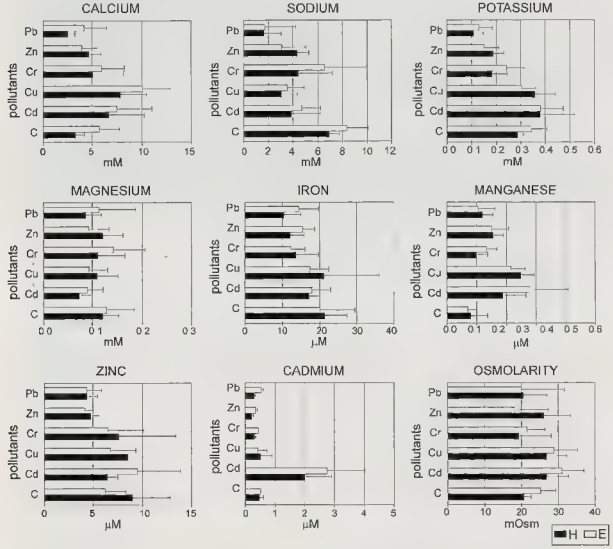

Figure 1. Concentration of calcium, sodium, potassium, magnesium, iron, manganese, zinc, and cadmium and total osmolarity of the fluids, haemolymph (H) and extrapallial fluid (E) of *A. ygnea* specimens (n=6), exposed to different treatments: heavy metals; and control (C).

animals. Manganese results reached higher values in haemolymph at those same conditions. The magnesium contents presented a trend slightly similar to the sodium profile although showing greater stabilization.

The incubation with lead or zinc is related to the lowest ionic levels, with respect to almost all metals. Total osmolarity shows the same pattern as calcium, the major ion present in these fluids. The chromium lead and copper metals were not measured since they presented infraliminar levels of detection.

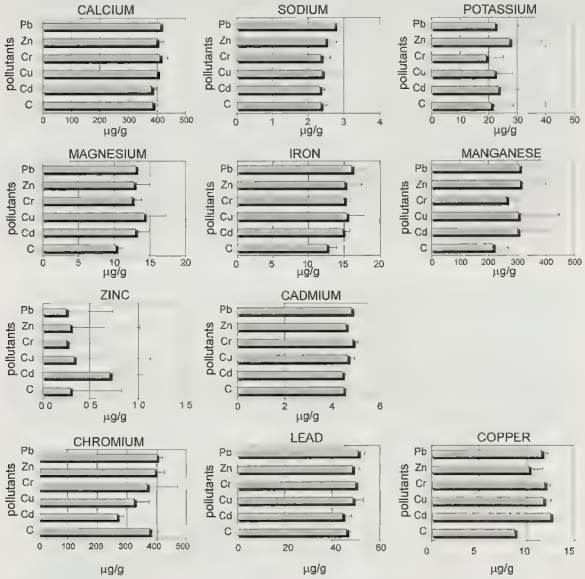

Figure 2 Levels of calcium, sodium, potassium, magnesium, iron, manganese, zinc, cadmium, chromium, lead and copper in the nacreous layers of *A. cygnea* specimens (n=6), exposed to different treatments: heavy metals; and control (C).

Shell nacre

No significant differences were detected between control and any treatment group with respect to Ca, K, Fe, Mn and Zn metals (Figure 2). This is mainly due to the high variability of the results, since some trends can still be detected by the observation of the graphics, such as the overall higher iron amounts seen in all experimental situations when compared to the experiment control. Copper is the only metal to be present in the experimental groups, especially the cadmium group, in significantly higher amounts than those reported for the control. A trend for deposition of higher cadmium contents was observed in the experiments with zinc-exposed animals. As significant results, one can describe the low chromium amounts of the shells from animals incubated with cadmium.

DISCUSSION

The large amount of ecotoxicological studies on heavy metal bioaccumulation in molluscs dealt mainly with the soft tissues (Frazier, 1975; Lingard *et al.*, 1992) and only a minority focused their attention on the biological fluids. Biological fluids of invertebrate can be changed under pollutant-exposure stress (Kaim-Malka *et al.*, 1990) the dose accumulated of each metal being directly proportional to its respective availability. This have been claimed for a large number of bivalves, for example in *Mytilus edulis* with Pb (Sturenson, 1976), Zn (George and Pirie 1980), and Cd (Fowler and Benayoun, 1974), in *Tapes decussatus* for Cr (Chipman, 1966); in *Crassostrea virginica* for Cr and Pb (Shuster and Pringler, 1969); in *Protothaca staminea* for Cu (Roesijadi, 1980); in *Amblema costata* for Ca (Pietrzak *et al.*, 1976), and in *Anodonta nuttaliana* for Mn and Zn (Harrisson, 1969).

In the present results, there is significant evidence for the fluid accumulation of Cd in response to environmental increases. On the contrary, Zn do not seem to be accumulated, since it is even decreased in its respective group. Actually, Cd and Zn are sometime considered biologically antagonistic because of their similar physicochemical properties (Devineau and Amiard-Triquet, 1985), which might lead to some contrary trends, as seen here.

The eventual accumulation of trace metals in the mollusk shell, in response to ambient contamination, a feature frequently reported (Imlay, 1982; Lingard *et al.*, 1992; Manly and George, 1977; Simkiss, 1983 and Sturensson, 1976), will also logically depend on its availability on the extrapallial fluid, and this in turn is dependent on the animal's regulation capability (Simkiss,1983), obviously involving the haemolymph compartment. Our results of the nacre ionic analyses after heavy metal contamination suggest that at least Pb and Cu are accumulated in the shell nacre, in response to increased environmental levels. This was not the case with Cd, whose levels in the shell did not increase at all. Interestingly, there seems to be an opposite tendency between these heavy metals, with respect to their accumulation either in the shell or in the biological fluids, particularly visible in the case of Cd, much increased in the fluids but showing no alteration in the shell. As well explained by Frazier (1976), any deviation, with respect to the pattern of metal discrimination between shell and soft tissues, must be seen as the effect of the specific failure of biological control, as a result of the toxic effect of metal pollution itself.

Copper, on the other hand, is known for its acute toxicity on mussels (Simkiss and Mason 1983), with dead arising above 25 $\mu g\ l^{-1}$ (Hummel *et al.*, 1996). The high toxicity of copper has already been tested in *A. cygnea* with similar results (Salanki and Varanka, 1976). In fact, this toxicity is actively avoided by these animals, either through protein sequestering (Rtal and Truchot, 1996), or by a strong decrease of the pumping activity (Grace and Gainey, 1987), which highly increases the isolation from the exterior, thus causing acidosis. This isolation can be so efficient that it may cause an effective lack of Cu accumulation (Mersh *et al.*, 1993), perhaps the reason why the copper fluid levels remained under the reading sensibility, even in copper exposed animals. It is interesting to note that this metal caused the highest calcium level of all the experimental groups, but only on the extrapallial fluid, a feature that probably passes through the disturbance of the ionic transport activity of the mantle epithelium, as detected for the Na^+/K^+ ATPase activity in the gill of crabs (Weekes *et al.*, 1993). In fact, the exposure to this heavy metal revealed several ionic significant changes, such as a low sodium level.

No important effect on the chromium-exposed specimens could be detected here, in comparison to the control group, which agrees with the fact that chromium is not considered a very toxic metal for molluscs (Byran, 1971).

Some of the above mentioned experimental situations yielded higher calcium levels in the fluids that have to be related with acidosis occurrence, namely in view of the natural response of these animals to hazardous external environments, probably related with the characteristic trend of this metal in this particular species, in which the extracellular mineral concretions take an active place (Zandee *et al.*, 1980; Machado *et al.*, 1988).

CONCLUSION

It is visible in these results the different overall behavior of essential elements (Zn and Cu) in comparison with non-essential ones (Cd, Pb and Cr). In fact, Zn seems to be truly regulated, although with major disturbance of ionic balance as a consequence of very prolonged exposure. Cu is also sufficiently avoided by these animals at the fluids level, probably through a good isolation from the exterior, coupled with an efficient removal from the fluids towards nacre, causing the accumulation now detected. With non essential metals Cd and Pb accumulation is the main result, either in the biological fluid or in nacre, probably to overcome the absence of regulation. The only exception to this trend is Cr, a metal that probably did not enter the organisms in effective amounts.

The effects now described of these heavy metals on the normal ionic composition pattern of this species, will probably mean some degree of interference with the outcoming shell, produced under these abnormal conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a JNICT grant (Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, Portugal).

LITERATURE CITED

Auernheimer C , Llavador F & Pina J A 1984. Chemical minority element in bivalve shells A natural model (Mar Menor, Spain) *Archives des Sciences et Compte Rendu des Séances de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève* **37**: 317-331

Brown P.L , Jeffree R A & Matkich S J. 1996. Kinetics of Ca^{45}, Co^{60}, Pb^{210}, Mn^{54} and Cd^{109} in the tissue of the freshwater bivalve *Velesunio angasi* Further development of a predictive and mechanistic model of metal bioaccumulation. *The Science of the Total Environment* **188**. 139-166.

Bryan G W 1971 The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms *Proceedings of the Royal Society of London* (Series B) **177**: 389-410

Butler C A & Timperley M.H. 1996. Fertilized farmland as a source of cadmium in oysters. *The Science of the Total Environment* **181**: 31-44.

Carriker M R , Palmer R E , Sick L V.& Johnson C C. 1980. Interaction of mineral elements in sea water and shell of oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin)) cultured in controlled and natural systems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **46**· 279-296

Chipman W.A 1966 Uptake and accumulation of chromium^{51} by the clam *Tapes decussatus* in relation to physical and chemical form. *In:* Disposal of Radioactive Waste into Seas, Oceans and Surface Waters 571-582. Int. At Energy Agency, Vienna.

Devineau, J & C. Amiard Triquet 1985 Patterns of bioaccumulation of an essential trace element (zinc) and a pollutant metal (cadmium) in larvae of the prawn *Palaemon serratus*. *Marine Biology* **86** 139 143.

Dodd J R 1965 Environmental control of strontium and magnesium in *Mytilus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **29**. 385-398

Fowler S.W & Benayoun G 1974 Experimental studies on cadmium flux through marine biota pp 159-179. *In:* Radioactivity in the Sea. Comparative Studies of Food and Environmental Contamination· No. 44 Int. At Energy Agency. Vienna

Frazier J M 1975 The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. I. Seasonal effects *Chesapeake Science* **16**: 162-171.

Frazier J M 1976. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica* II. Environmental effects. *Chesapeake Science* **17**: 188-197.

George S G & Pirie B J S. 1980. Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis*: a combined ultrastructural and biochemical study *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* **60:** 575-590

Grace A L. & Gainey L F.1987. The effects of copper on the heart rate and filtration rate of *Mytilus edulis Marine Pollution Bulletin* **18**: 87-91

Harrison F L. 1969. Accumulation and distribution of ^{54}Mn and ^{65}Zn in freshwater clams. *In:* (D J. Nelson & F C. Evans, eds) 198-220 Proceeding of 2nd National Symposium on Radioecology CONF-670503. US Dep. Commer. Springfield, Virginia

Hummel H , Amiard-Triquet C , Bachelet G , Desprez M , Marchand J , Sylvand B , Amiard J.C., Rybarczyk R , Bogaards R H., Sinke J & DeWolf L.1996 Free amino acids as a biochemical indicator of stress in the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *The Science of the Total Environment* **188**: 233-241.

Imlay M.J. 1982. Use of shells of freshwater mussels in monitoring heavy metals and environmental stresses: a review. *Malacological Review* **15**: 1-14.

Kaim-Malka R.A., Ceccaldi H.J. & Grosjean M. 1990. Hemolymph proteins of *Idotea balthica basteri* (Crustacea: Isopoda) exposed to the chronic effect of a non-ionic detergent. *Comparative Biochemistry and Physiology* **95B**: 233-246.

Lerman A. 1965. Strontium and magnesium in water and in *Crassostrea* calcite. *Science* **150**: 745-751.

Lingard S.M., Evans R.D. & Bourgoin B.P. 1992. Method for the estimation of organic-bound and crystal-bound metal concentrations in bivalve shells. *Bulletin of Environmental Contamamination and Toxicology* **48**: 179-184.

Machado J., Coimbra J., Sá C. & Cardoso I. 1988. Shell thickening in *Anodonta cygnea* by induced acidosis. *Comparative Biochemistry and Physiology* **91A(4)**: 645-651.

Manly R. & George W.O. 1977. The occurrence of some heavy metals in populations of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (L.) from the River Thames. *Environmental Pollution* **14**: 139-154.

Mersch J., Morhain E. & Mouvet. C. 1993. Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere* **27**: 1475-1485.

Moura G., Vilarinho L. Guedes R & Machado J. 2000. The action of some heavy metals on the calcification process of *Anodonta cygnea* (Unionidae): nacre morphology and composition changes. *Haliotis* **29**: 43-53.

Palmer A.R. 1983. Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods. *Marine Biology* **75**: 287-292.

Pietrzak J.E., Bates J.M. & Scott. R.M. 1976. Constituents of unionid extrapallial fluid. II. pH and metal ion composition. *Hydrobiology* **50**: 89-93.

Pilkey O.H. & Hower J. 1960. The effect of environment on the concentration of skeletal magnesium and strontium in *Dendraster*. *Journal of Geology* **68**: 203-216.

Roesijadi G. 1980. Influence of copper on the clam *Protothaca staminea*. Effects on gills and occurrence of copper-binding proteins. *Biological Bulletin* **158**: 233-247.

Rtal A. & Truchot J.P. 1996. Haemolymph transport and tissue accumulation of exogenous copper in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Pollution Bulletin* **32**: 802-811.

Salanki J. & Varanka I. 1976. Effect of copper and lead compounds on the activity of the freshwater mussel. *Annales Instituti Biologici (Tihany) Hungaricae Academiae Scientiarum* **43**: 21-27.

Segar D.A., Collins J.D. & Riley J.P. 1971. The distribution of the major and some minor elements in marine animals. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* **51**: 131-136.

Shuster C.N. & Pringle B.H. 1969. Trace metal accumulation by the American eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **59**: 91-103.

Simkiss K. & Mason A.Z. 1983. Metal ions: metabolic and toxic effects. *In:* The Mollusca, Vol. 2. (P.W. Hochachka ed.): 101-164. Academic Press, New York.

Simkiss K. 1965. The organic matrix of the oyster shell. *Comparative Biochemistry and Physiology* **16**: 427-435.

Simkiss K. 1983. Trace elements as probes of biomineralization. *In:* Biomineralization and biological metal accumulation. (P. Westbroek & F. W. Jong (eds): 363-371. D. Reiner, Dordrecht, Holland.

Sturesson U. 1976. Lead enrichment in shells of *Mytilus edulis*. *Ambio* **6**: 253-256.

Usero J., Gonzalezregalado E. & Gracia I. 1996 Trace metals in the bivalve mollusk *Chamelea gallina* from the Atlantic coast of Southern Spain. *Marine Pollution Bulletin* **32**: 305-310.

Wada K. & Fujinuki T. 1976. Biomineralization in bivalve mollusks with emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluid.. *In:* The mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants. (N. Watabe & K.M. Wilbur eds): 175-190 University of South Carolina Press, Columbia.

Weekes J.M., Jensen F.B. & Depledge M.H. 1993. Acid-base status, haemolymph composition and copper accumulation in shore crabs *Carcinus maenas* exposed to combined copper and salinity stress. *Marine Ecology Progress Series* **97**: 91-98.

Zandee D.I., Kluytmans J.H., Zurburg W. & Pieters H. 1980. Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research* **14**: 1-29.

BIBL. DU MUSÉUM PARIS

Normes diverses

Les noms de taxa devront être cités et utilisés conformément au Code International de Nomenclature Zoologique (édition de 1985). Les noms génériques ou spécifiques seront écrits en *italique*, les noms de familles ou de divisions d'un rang plus élevé, en caractères normaux. Un nom spécifique, générique ou familial apparaissant pour le première fois dans le texte devra être accompagné de son auteur et date de publication. Auteur et date d'un taxon seront toutefois omis dans le titre de l'article. On évitera les tournures de phrases donnant lieu à confusion entre une référence bibliographique et l'auteur et date d'un taxon.

La bibliographie comprendra toutes les références citées dans le texte, et uniquement celles-ci. Toutefois, les références citées uniquement en tant qu'auteur et date d'un taxon ne sont pas obligatoirement incluses dans la bibliographie. Les titres des périodiques doivent apparaître *in extenso*. Les références seront citées selon un des modèles suivants:

Bourguignat J.R., 1857. Aménités malacologiques. *Revue et magasin de zoologie* (2)**9**: 3-31, pl. 1-4.

Swofford D.L. & Olsen G.J., 1990. Phylogeny reconstruction. *In:* Molecular systematics. (D.M. Hillis & C. Morris, eds.) : 411-501. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets.

Dans le texte, on citera les références sous la forme "... selon Hall (1986)... ", " (Hall and Smith, 1986)", (Richardson *et al.*, 1985)...". Pour plusieurs articles d'un même auteur et d'une même date, on utilisera la forme "1985a, 1985b..."

Les tirés-à-part devront être commandés au moment des épreuves. Pour chaque article, 25 tirés-à-part gratuits seront envoyés aux auteurs. Des tirés-à-part supplémentaires, payants, pourront être commandés au même moment.

Comité de rédaction

Patrick ARNAUD	Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille
Alan BEBBINGTON	3 Crawley Lane, Uley, Nr Dursley, Glos GL11 5 BJ, GrandeBretagne
Alain BODOY	IFREMER, Rue de l'Ile d'Yeu,B.P. 1049 - 44037 Nantes cedex 01
Pio FIORONI	Universität Münster, Institut für Spezielle Zoologie und Vergleichende Embryologie, Hüfferstraße 1, D-48149 Münster, Allemagne
Serge GOFAS	Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Espagne
Marcel LE PENNEC	Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences , 6 avenue Le Gorgeu, 29283 Brest cedex
Pierre LUBET	Laboratoire de Zoologie, I.B.B.A., Faculté des Sciences, 14032 Caen cedex
Mathieu POULICEK	Laboratoire d'Ecologie marine, Institut de Zoologie, Université de Liège, 22 Quai van Beneden, B - 4020 Liège, BELGIQUE
Jean TARDY	Laboratoire de Biologie, Biochimie marines et Phytoécologie, IUT, Rue François de Vaux de Foletier, 17026 La Rochelle cedex
Nardo VICENTE	C.E.R.A.M., Faculté des Sciences et Techniques, de Saint Jérôme, 13397 Marseille cedex 13

Directeur de la publication : Pierre LUBET, Président de la S.F.M.
Coordonnateur de ce volume : Serge GOFAS

Société Française de Malacologie - siège : 55, rue Buffon, F-75005 Paris ISSN: 0397.765 X
Imprimé en Espagne par Imagraf, Málaga - Achevé d'imprimer le 15 décembre 2001

Sommaire

J. Chavez-Villalba, C. Mingant, J.C. Cochard & M. Le Pennec
Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction 1

N. Trigui el Menif, M. Le Pennec & A. El Abed
Variabilite génétique de la palourde *Ruditapes decussatus* de la côte nord-est tunisienne 13

J. Daget
Sur la forme typique de *Limicolaria kambeul* (Gastropoda, Achatinidae) 23

G. Moura, M.J. Almeida, M.J.C. Machado & J. Machado
Effects of heavy metal exposure on ionic composition of fluids and nacre of *Anodonta cygnea* (Unionidae) 33